

**DNA-Origami-Nanostrukturen als modulare Plattform für die  
photophysikalische Charakterisierung einzelner fluoreszierender Moleküle  
und die superauflösende Fluoreszenzmikroskopie**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades  
einer Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von Ija Jusuk  
aus Shdanow / Ukraine

1. Referent: Professor Dr. Philip Tinnefeld

2. Referent: Privatdozent Dr. Christof Maul

eingereicht am: 29.11.2017

mündliche Prüfung (Disputation) am: 23.01.2018

Druckjahr 2018

---

## Vorveröffentlichungen der Dissertation

### Publikationen

1. Jusuk, I., Vietz, C., Raab M., Dammeyer T., Tinnefeld, P.: Super-Resolution conditions for enhanced yellow fluorescent protein (eYFP) demonstrated on DNA origami nanorulers. *Scientific Reports*, 5, 14075 (2014).
2. Raab, M., Jusuk, I., Molle, J., Buhr, E., Bodermann, B., Bergmann, D., Bosse, H., Tinnefeld, P.: Using DNA origami nanorulers as traceable distance measurement standards and nanoscopic benchmark structures. *Scientific Reports*, 8, 1780 (2018).

### Posterbeiträge

1. Jusuk, I., Vietz, C., Pibiri, E., Raab, M., Schmied, J., Gietl, A., Dammeyer, T., Tinnefeld, P.: Semisynthetic protein-DNA conjugates for orthogonal decoration of DNA origamis. (Poster) 19.th International Workshop, Single Molecule Spectroscopy und Ultra Sensitive Analysis in the Life Science, PicoQuant, Berlin (2013).
2. Jusuk, I., Vietz, C., Pibiri, C., Raab, M., Schmied, J., Dammeyer, T., Tinnefeld, P.: Superresolution fluorescence imaging of nanopatterned DNA-origamis with semisynthetic fluorescent protein-DNA conjugates. (Poster) 20.th International Workshop, Single Molecule Spectroscopy und Ultra Sensitive Analysis in the Life Science, PicoQuant, Berlin (2014).
3. Jusuk, I., Vietz, C., Dammeyer, T., Raab, M., Tinnefeld, P.: Superresolution fluorescence imaging of nanopatterned DNA-origamis with semisynthetic fluorescent protein-DNA conjugates. (Poster) International Workshop, DNA-Based Nanotechnology: Digital Chemistry, Max Plank, Dresden (2014).
4. Jusuk, I., Vietz, C., Dammeyer, T., Raab, M., Tinnefeld, P.: Superresolution imaging conditions for enhanced yellow fluorescent protein (eYFP) demonstrated on DNA origami nanorulers. (Poster) International Summer School on Metrology, PTB, Drübeck (2015).
5. Jusuk, I., Tinnefeld, P.: Photophysics and superresolution fluorescence microscopy using DNA origami technique. (Poster). International Summer School on Metrology, PTB, Drübeck (2016).

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Kurzfassung</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b>	<b>13</b>
3.1	Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	13
3.1.1	Fluoreszenz . . . . .	13
3.1.2	Fernfeld-Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	15
3.1.3	Einzelmoleküldetektion . . . . .	18
3.1.4	Fluorophorklassen . . . . .	21
3.1.4.1	Organische Fluoreszenzfarbstoffe . . . . .	21
3.1.4.2	Fluoreszierende Proteine . . . . .	23
3.1.5	Photophysikalische Eigenschaften von Fluorophoren . . . . .	29
3.1.5.1	Triplett-Quencher . . . . .	31
3.1.6	Beugungsgrenze . . . . .	35
3.2	Superauflösende Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	38
3.2.1	STED . . . . .	38
3.2.2	Lokalisierungsbasierte Superauflösungsmikroskopie . . . . .	40
3.2.2.1	Photoschalten mit aliphatischen Thiolen (dSTORM) . . . . .	45
3.2.2.2	Lokalisierungsbasierte Superauflösungsmikroskopie mit FPs . . . . .	48
3.2.3	DNA-Origami-Nanostrukturen als Referenzproben für die Super- auflösungsmikroskopie . . . . .	51
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>59</b>
4.1	EYFP-spezifische Probenvorbereitung . . . . .	59
4.1.1	Rekombinante Produktion und Aufreinigung von EYFP . . . . .	59
4.1.2	Synthese und Analyse von EYFP-DNA-Konjugaten . . . . .	60
4.1.3	Fluoreszenzmarkierung des Nanoantikörpers . . . . .	61
4.2	Probenvorbereitung für Einzelmolekülmessungen . . . . .	62
4.2.1	DNA-basierte Proben . . . . .	62
4.2.2	Passivierung von Glasoberflächen für Objektiv-TIRF . . . . .	64
4.2.3	Passivierung von Glasoberflächen für PRISM-TIRF . . . . .	64
4.2.4	Chemische Bedingungen für Einzelmolekülmessungen . . . . .	65



4.3	Mikroskopaufbau für Einzelmolekülmessungen . . . . .	66
4.3.1	Objektiv-TIRF . . . . .	66
4.3.2	PRISM-TIRF . . . . .	67
4.3.3	EMCCD-Kamera . . . . .	67
4.3.4	Aufnahmebedingungen für Einzelmolekülmessungen . . . . .	69
4.4	AFM . . . . .	70
4.5	Kalibrierung des Objektmikrometers . . . . .	71
4.6	Pixelgrößenbestimmung . . . . .	72
4.7	DNA-Origami-Abstandsberechnung . . . . .	74
4.8	Auswertung . . . . .	75
4.8.1	Spoterkennung . . . . .	75
4.8.2	Auswertung der Fluoreszenzspuren . . . . .	76
4.8.3	Bildgenerierung in der LB-Superauflösungsmikroskopie . . . . .	77
4.8.4	Automatische Abstandsbestimmung . . . . .	78
4.8.5	Monte-Carlo-Simulationen . . . . .	79
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>80</b>
5.1	Kombination eines Redoxsystems (ROXS) mit dSTORM . . . . .	80
5.1.1	Photophysikalische Untersuchungen von Cyanin-Farbstoffen unter dSTORM mit ROXS . . . . .	80
5.1.2	Superauflösungsmikroskopie unter dSTORM mit ROXS . . . . .	86
5.2	Optimierung der photophysikalischen Eigenschaften von EYFP . . . . .	89
5.2.1	Herstellung von EYFP-DNA-Konjugaten . . . . .	89
5.2.2	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von photophysikalischen EYFP-Eigenschaften . . . . .	93
5.2.3	Charakterisierung von EYFP-Superauflösungsteststrukturen . . . . .	95
5.2.4	Superauflösungsmikroskopie mit EYFP-DNA-Konjugaten . . . . .	98
5.3	Rückführung von fluoreszenzmarkierten DNA-Origami-Strukturen . . . . .	103
5.3.1	Vorstellung der Vorgehensweise . . . . .	103
5.3.2	Aufstellung des Messunsicherheitsbudgets . . . . .	106
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>114</b>
<b>7</b>	<b>Literatur</b>	<b>120</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>131</b>

<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>132</b>
<b>10</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>157</b>
<b>11</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>160</b>
<b>12</b>	<b>Danksagung</b>	<b>161</b>

# 1 Kurzfassung

Die Entwicklung superauflösender Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht es, die naturgegebene Beugungsgrenze des Lichtes von rund 250 nm zu überwinden und somit Objekte im Nanometerbereich besser und genauer abzubilden. Um die Auflösung von Mikroskopen zu testen sowie Vergleiche zwischen unterschiedlichen superauflösenden Methoden zuverlässig zu gestalten, eignen sich am besten fluoreszenzmarkierte DNA-Origami-Strukturen, sogenannte Nanometerlineale. Dabei handelt es sich um DNA-basierte, programmierbare, selbstassemblierte Nanostrukturen, welche als molekulare Plattform zum Platzieren von DNA-funktionalisierten Fluorophoren in einem frei wählbaren Abstand mit ca. 1 nm Präzision fungieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, wie photophysikalische Eigenschaften der synthetischen Cyanin-Farbstoffe auf Einzelmolekülebene im Hinblick auf die lokalisierungsbasierte Superauflösungsmethode dSTORM optimiert werden konnten. Das Augenmerk dieser Untersuchungen lag auf der Maximierung der Photonenzahl pro Anzustand bzw. Lokalisierung, indem dSTORM mit unterschiedlichen Triplet-Quenchern wie Cyclooctatetraen und einem Redoxsystem (ROXS) kombiniert und miteinander verglichen wurde. In beiden Fällen konnten die Anzustände signifikant verlängert werden, wobei unterschiedliche Wirkungsmechanismen der eingesetzten Triplet-Quencher identifiziert wurden. Die Untersuchungsergebnisse einzelner Farbstoffe konnten anhand der DNA-Origami-Nanometerlineale direkt auf die Superauflösungsmikroskopie übertragen werden, so dass eine Verdreifachung der Photonenzahl pro Lokalisierung realisiert wurde. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Fluoreszenzmarkierungen für DNA-Origami-Strukturen mit fluoreszierenden Proteinen wie EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) zu erweitern. Hierzu wurden fluoreszierende Proteine mittels Genexpression in *E. coli*-Zellen produziert und unter Aufrechterhaltung der Fluoreszenzfähigkeit stöchiometrisch kontrolliert an DNA gekoppelt. Einzelmolekül-Fluoreszenzuntersuchungen unter Benutzung der DNA-Origami-Strukturen ergaben zwar ein Blinkverhalten im Millisekundenbereich, jedoch blieben die photophysikalischen EYFP-Eigenschaften wie z.B. Photostabilität optimierungsbedürftig. Unter Benutzung von chemischen Bedingungen der dSTORM-Superauflösungsmethode (Sauerstoffentzug und aliphatische Thiole) konnte ein stark stabilisierender Effekt auf EYFP-Moleküle festgestellt werden. Diese Ergebnisse wurden ebenso anhand der lokalisierungsbasierten Superauflösungsmikroskopie der mit EYFP markierten Nanometerlineale und Mikrotubuli in Vero-Säugerzellen verifiziert. Dieser stabilisierende Effekt äußerte sich in superaufgelösten Bildern durch eine erhöhte Zahl an erhaltenen Lokalisierungen und somit durch verbesserte Qualität und mehr struk-

turelle Information. Im letzten Schritt wurden nanometrologische Untersuchungen unternommen, um die DNA-Origami-Nanometerlineale, welche bis jetzt nur als Teststrukturen benutzt wurden, zu Standards im nanometrischen Längenbereich weiterzuentwickeln. In Kooperation mit der PTB aus Braunschweig wurde ein Kalibrierverfahren für die Rückführung der gemessenen superaufgelösten Abstände mit dazugehöriger Aufstellung eines Messunsicherheitsbudgets entwickelt.

## 2 Einleitung

Es wurde schon im 16. Jahrhundert versucht, kleine Objekte unter einem Lichtmikroskop zu vergrößern. Aufgrund der Wellennatur des Lichtes beträgt die Auflösung jedes Lichtmikroskops in etwa die Hälfte der Wellenlänge (ca. 250 nm), was der Größe einer Zellorganelle entspricht. Somit blieb das Mikroskop für die Auflösung kleinerer Strukturen blind. Der Fortschritt und zahlreiche wissenschaftliche Erkenntnisse in den Bereichen der Biologie und Medizin sowie in ähnlichen naturwissenschaftlichen Teildisziplinen sind eng an die Entwicklung neuer und leistungsstarker Mikroskopiemethoden gekoppelt. Die Entwicklung der Elektronenmikroskopie in den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts stellte einen Meilenstein in der Mikroskopie dar. Diese Methode übertraf das Auflösungsvermögen der Lichtmikroskopie um das Tausendfache, da die Elektronenstrahlen wesentlich geringere Wellenlängen haben. Der Nachteil der Elektronenmikroskopie besteht jedoch in den harschen Aufnahmebedingungen wie Vakuum und hochenergetische Strahlen, die für viele biologische Untersuchungen schlecht geeignet sind. Hingegen sind lichtmikroskopische Methoden deutlich schonender. Dabei spielt Fluoreszenzmikroskopie eine wichtige Rolle, bei der fluoreszenzmarkierte Objekte abgebildet werden. Das Problem vieler biologischer Proben besteht im mangelhaften Kontrast transparenter Materialien, so dass die kontrastgebende, spezifische Fluoreszenzmarkierung von Vorteil ist. Seit der Entwicklung der Einzelmoleküldetektion [1, 2] in den frühen 90er Jahren erlangen die fluoreszenzbasierten Techniken eine stetig wachsende Popularität und ermöglichen die Erschließung komplett neuer Forschungsfelder. Zunehmend stiegen die Anforderungen an die Fluoreszenzfarbstoffe, denn sie wurden nicht mehr nur als einfache Lichtpunkte einer Farbe betrachtet, sondern ihre Auswahl war eng an die Spezifität der experimentellen Fragestellungen gebunden. Der Bedarf an einer detaillierten Charakterisierung und Optimierung photophysikalischer und spektroskopischer Eigenschaften der Farbstoffe trieb andererseits die Weiterentwicklung der Einzelmolekül-Fluoreszenzmethoden voran. Die Entdeckung einer gezielten Anpassung der photophysikalischen Eigenschaften der Farbstoffe auf Einzelmolekülebene durch externe chemische Bedingungen stellt einen weiteren Meilenstein der Entwicklung in der Fluoreszenzmikroskopie dar. Auf diese Weise konnte beispielsweise unter Zugabe eines Redoxsystems (ROXS) [3] ein über mehrere Minuten stabiles Fluoreszenzsignal generiert werden. Durch Zugabe von aliphatischen Thiolen und unter Einsatz einer Reaktivierungslichtquelle wurde alternativ ein molekularer reversibler Photoschalter erzeugt [4, 5]. Der entscheidende Vorteil dieser externen Modulation der Fluoreszenz durch die chemische Umgebung oder durch Licht ist ihre Universalität, so dass die Eigenschaf-

ten desselben Farbstoffs an die gewünschten experimentellen Anforderungen angepasst werden können. Nach wie vor stand jedoch die scheinbar unüberwindbare Beugungsgrenze der Fluoreszenzmikroskopie vielen Anwendungsmöglichkeiten im Wege. Das Problem aus einer anderen Perspektive zu betrachten, brachte schließlich den Durchbruch. Der Lösungsansatz bestand darin, die naturgegebene Beugungsgrenze nicht zu brechen, sondern durch geschickte und geistreiche Tricks zu umgehen. Diese Methoden werden als Superauflösungsmikroskopie bezeichnet. Die erste praktisch realisierte Superauflösungsmethode ist die STED Mikroskopie (STED: stimulated emission depletion) (1999), bei der das effektive fokale Anregungsvolumen künstlich verkleinert wird [6]. Eine weitere sehr verbreitete Technik wird als sogenannte lokalisierungsbasierte Superauflösungstechnik [7] bezeichnet (s. Abbildung 2.1), die eine zentrale Rolle in dieser Arbeit spielt. Sie beruht auf dem Prinzip der Lokalisation bzw. Bestimmung der Position einzelner Emitter, die zeitlich und räumlich separat voneinander im beugungsbegrenzten Regime detektiert werden.

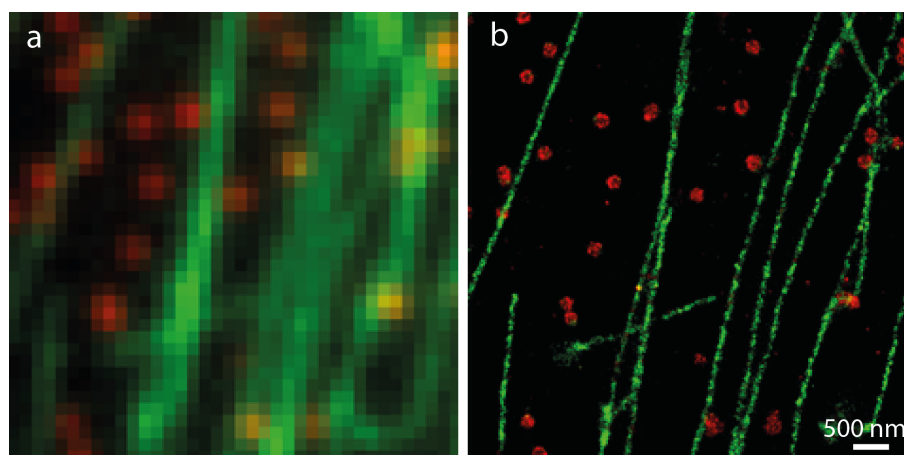


Abbildung 2.1: (a) 2-Farben beugungsbegrenztes und (b) supraaufgelöstes Bild von zellulären Mikrotubuli und Clathrin-umhüllten Vesikeln durch lokalisierungsbasierte Superauflösungsmikroskopie [8].

Es gibt zahlreiche Wege, um diese zeitliche Modulation der Fluoreszenz zu realisieren. Dazu gehört z.B. das oben erwähnte reversible Photoschalten durch Thiole (d)STORM, transientes Anbinden diffundierender Fluorophore an die zu untersuchende Struktur (DNA-PAINT) [9] sowie irreversible Photoaktivierung (PALM) [10]. Die letztere galt in ihrer ersten Realisierung für fluoreszierende Proteine, die als genetisch kodierte Fluoreszenzmarker bevorzugt für Bildgebung lebender Zellen eingesetzt werden. Im Regelfall führen diese Superauflösungstechniken zu einer verbesserten lateralen Auflösung von ca. 20 nm. Die herausragende Rolle dieser Methoden wurde durch die Verleihung des Nobelpreises

für Chemie 2014 unterstrichen. Die Weiterentwicklung bestehender und Etablierung neuer supraauflösenden Methoden in 2D und 3D schreitet ungebrochen voran. Angesichts dieser Entwicklung stellt sich die Frage, wie diese Methoden zuverlässig miteinander verglichen werden können und wie ihr maximales Auflösungsvermögen getestet werden kann. Notwendig sind Nanostrukturen mit einem Muster aus Fluoreszenzmarkierungen mit klar definierten, homogenen und reproduzierbaren Eigenschaften bezüglich des aufzulösenden Abstands und der Markierungsdichte. Konventionell wurden fluoreszenzmarkierte Filamente (Mikrotubuli, Aktinfilamente, s. Abbildung 2.1, grün) zu diesem Zwecken eingesetzt, die aber nur bedingt die gestellten Anforderungen erfüllen. Der gemessene Abstand zwischen zwei zufällig parallel verlaufenden Filamenten wurde häufig zur Demonstration der Auflösung benutzt. Die Anordnung dieser Filamente ist jedoch nicht reproduzierbar und der erwartete theoretische Abstand ist immer eine Unbekannte. Außerdem entspricht der aufgelöste Abstand nicht immer dem maximal möglichen Auflösungsvermögen der jeweiligen Methode. Die neuesten Entwicklungen der strukturellen DNA-Nanotechnologie lieferten hierfür 2006 einen völlig neuen Ansatz, indem DNA in programmierbare künstliche Strukturen im Nanometerbereich gefaltet werden kann [11] (s. Abbildung 2.2).

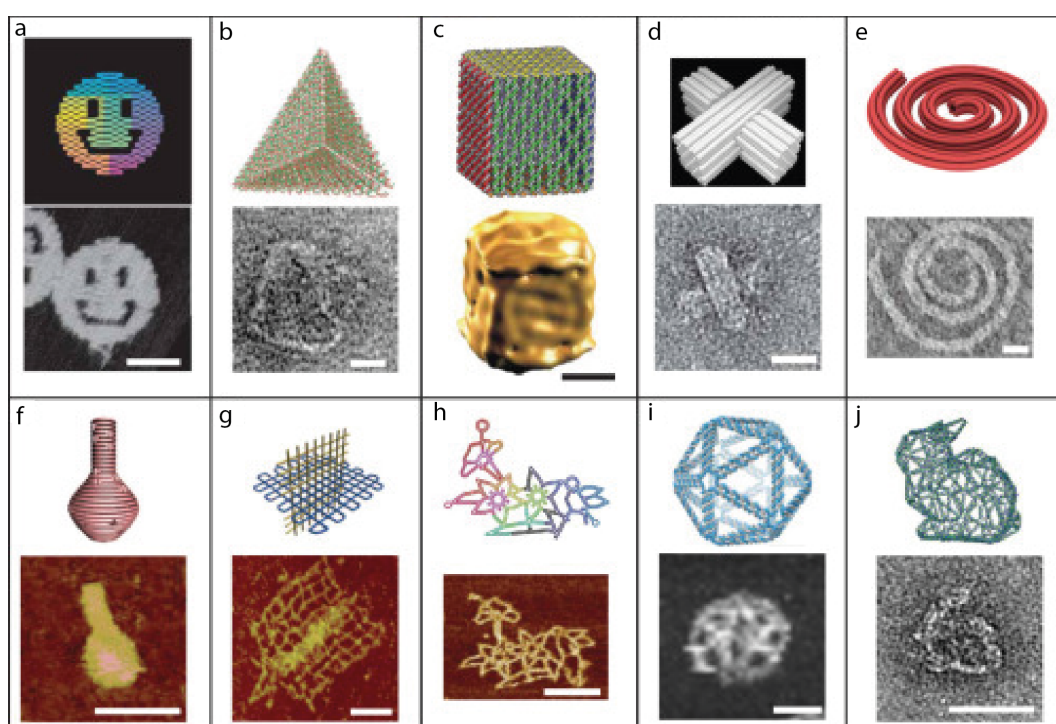


Abbildung 2.2: DNA-Origami-Nanostrukturen [12], Maßstabsbalken: 50 nm (a), 20 nm (b-e), 75 nm (f), 50 nm (g), 100 nm (h), 20 nm (i), 50 nm (j).

Ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit und Parallelisierung sowie die Möglichkeit zu unkomplizierter Platzierung von Farbstoffmolekülen mit ca. 1 nm Präzision begünstigte die Entwicklung von sogenannten DNA-Origami-Nanometerlinealen bzw. Teststrukturen. Dabei handelt es sich um selbstassemblierte DNA-Strukturen, die mit zwei oder mehreren Fluoreszenzmarkierungen in gewünschtem Abstand von wenigen Nanometern bis zu ca. 350 nm ausgestattet werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde demonstriert, wie vorteilhaft die DNA-Origami-Nanotechnologie in photophysikalischen Untersuchungen von synthetischen organischen Fluoreszenzfarbstoffen sowie fluoreszierenden Proteinen im Hinblick auf die für die Superauflösungsmikroskopie relevanten Eigenschaften eingesetzt werden können. Diese photophysikalischen Optimierungsprozesse konnten dank der DNA-Origami-Teststrukturen qualitativ und quantitativ untereinander verglichen werden. Die Kombination von fluoreszierenden Proteinen mit der DNA-Origami-Nanotechnologie befindet sich gerade erst am Anfang ihrer Entwicklung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden entscheidende Beiträge dazu geleistet, diese Methode zu etablieren. Seit 2009 entwickelten sich fluoreszenzmarkierte DNA-Origami-Strukturen hinsichtlich der Anwendung in der Superauflösungsmikroskopie von experimentellem Beweis der prinzipiellen Machbarkeit bis zu Entwicklung von kommerziell erhältlichen Teststrukturen. Um diese Teststrukturen als Standard für die Nanometerlängenskala zu bezeichnen, müssen sie unter Berücksichtigung zahlreicher nanometrologischer Aspekte kalibriert werden. Dabei kann die etablierte metrologische Herangehensweise in der makroskopischen Längenskala nur als grobe Richtlinie fungieren. Die Herausforderungen der Nanometrologie bestehen in der Fülle und der komplexen Verflechtung der Einflussfaktoren, die aber identifiziert und quantitativ abgeschätzt werden müssen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die ersten Schritte in Richtung der Standardisierung der DNA-Origami-Nanometerlineale unternommen, indem ein Kalibrierverfahren für die Messung der superaufgelösten Abstände entwickelt wurde.



## 3 Theoretische Grundlagen

In diesem Kapitel werden die theoretischen Grundlagen vermittelt, die für diese Arbeit von grundlegender Relevanz sind. Sie umfassen Fluoreszenz, photophysikalische Eigenschaften der Fluorophore, Superauflösungsmikroskopie und DNA-Origami-Nanotechnologie.

### 3.1 Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie

#### 3.1.1 Fluoreszenz

Fluoreszenz wird als spontane Lichtemission infolge einer elektronischen Anregung bezeichnet. Die elektronische Anregung erfolgt durch Absorption eines Lichtquants (Photon) geeigneter Wellenlänge. Die Zusammenhänge zwischen Absorption und Emission lassen sich durch das Jablonski-Diagramm veranschaulichen [13] (s. Abbildung 3.1 a). Die meisten Moleküle befinden sich zunächst im Schwingungsgrundzustand ( $v=0$ ) des elektronischen Singulett-Grundzustands ( $S_0$ ). Infolge der Anregung geht das Molekül in den ersten elektronisch angeregten  $S_1$ -Energiezustand mit unterschiedlichen Schwingungszuständen über. Aufgrund der deutlich geringeren Masse der Elektronen im Vergleich zu Atomkernen findet der Wechsel zwischen den Zuständen  $S_0$  und  $S_1$  so schnell ( $10^{-15}$  s) statt, dass sich der Kernabstand und somit die Molekülgeometrie kaum ändert. Dieser Sachverhalt wird als Franck-Condon-Prinzip (s. Abbildung 3.1 b) bezeichnet. Demnach sind diejenigen Übergänge ( $S_0 \rightarrow S_1$ ) am wahrscheinlichsten, bei denen die jeweiligen Vibrationswellenfunktionen am ähnlichsten sind. Daraus lässt sich die Intensitätsverteilung in Absorptionsspektren ableiten. Angeregte Schwingungszustände relaxieren danach strahlungslos in den Schwingungsgrundzustand ( $v'=0$ ) des  $S_1$ -Zustands (Schwingungsrelaxation). Die Energie wird in Bewegungsenergie (Wärme) umgewandelt. Von da aus fällt das elektronisch angeregte Molekül nach einer Zeitspanne im ns-Bereich (sogenannte Fluoreszenzlebensdauer) spontan unter Fluoreszenzemission zurück in den  $S_0$ -Zustand. Die Fluorophore (in Lösung und bei Raumtemperatur) fluoreszieren also immer aus dem  $S_1$ -Schwingungsgrundzustand (Kasha-Regel). Dieser Übergang kann allerdings auch strahlungslos (IC, engl. internal conversion) stattfinden. Aufgrund der oben erwähnten Schwingungsrelaxation innerhalb des  $S_1$ -Zustands ist das emittierte Fluoreszenzlicht immer zum langwelligeren elektromagnetischen Bereich hin verschoben (sogenannte Stokes-Verschiebung).

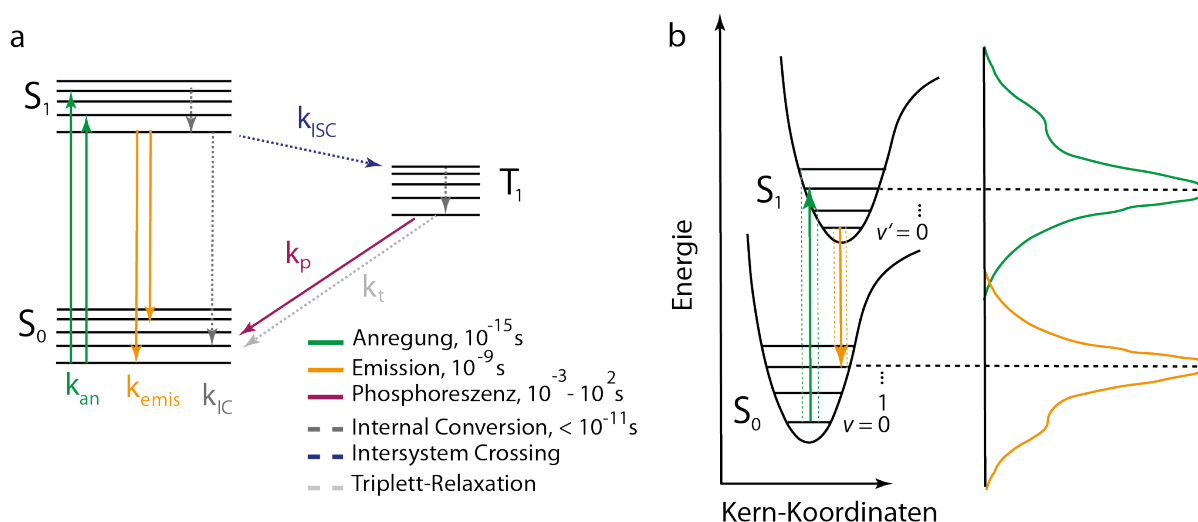


Abbildung 3.1: (a) Jablonski-Diagramm mit entsprechenden Übergängen mit jeweiligen Raten ( $k$ ) zwischen Singulett-Zuständen ( $S_0$ ,  $S_1$ ) und Triplett-Zustand ( $T_1$ ). (b) Franck-Condon-Prinzip beschreibt, dass die Übergänge zwischen den elektronischen Zuständen  $S_0$  und  $S_1$  umso wahrscheinlicher stattfinden, wenn die Wellenfunktionen der Vibrationsniveaus ( $v$ ) in  $S_0$  und  $S_1$  bei gegebenem Abstand am ähnlichsten sind bzw. am besten überlappen. Diese bevorzugten Übergänge sind als Pfeile (grün, orange) dargestellt.

Das Franck-Condon-Prinzip gilt auch für die Emission. Die Intensitätsverteilung eines Emissionsspektrums spiegelt die Schwingungsstruktur des elektronischen Grundzustands wider. Sind die Schwingungsstrukturen im  $S_0$  und  $S_1$  ähnlich, so sind Emissions- und Absorptionsspektren spiegelbildlich. Es gibt eine weitere Möglichkeit des indirekten Übergangs aus dem  $S_1$ - in den  $S_0$ -Zustand über den angeregten Triplett-Zustand ( $T_1$ ) unter Spinumkehr (Interkombination oder engl. Intersystem Crossing, ISC). Nach der Schwingungsrelaxation kann die Lebensdauer des  $T_1$ -Schwingungsgrundzustands im Bereich von Millisekunden bis Sekunden liegen, da der Übergang von  $T_1$  nach  $S_0$  spinverboten ist. Aus diesem Grunde fällt die Triplett-Besetzung dann mehr ins Gewicht, wenn Fluorophore infolge einer erhöhten Anregungsintensität häufiger im  $S_1$ -Zustand anzutreffen sind. Die Entvölkerung des  $T_1$ -Zustands kann strahlungslos oder in Form von Phosphoreszenz erfolgen. Fluoreszierende Moleküle (s. Kapitel 3.1.4) weisen in vielen Fällen ein konjugiertes  $\pi$ -Elektronensystem mit aromatischen Gruppen auf. Spektroskopische Eigenschaften eines Fluorophors hängen stark von seiner chemischen Struktur ab und lassen sich durch Fluoreszenzquantenausbeute ( $\Phi_{fl}$ ), Fluoreszenzlebensdauer ( $\tau_{fl}$ ) (s. Gleichungen 3.1 - 3.2) sowie Helligkeit beschreiben. Die Helligkeit wird durch das Produkt aus der Fluoreszenzquantenausbeute und dem Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon_{max}$ ) bei der Wellenlänge maximaler Absorption definiert (s. Gleichung 3.3). Diese charakteristischen Eigenschaften hängen

weitgehend von allen entvölkernden Prozessen ausgehend vom  $S_1$ -Zustand (Emission, IC, ISC) und somit von der chemischen Struktur des Fluorophores ab. Je kleiner die Energieunterschiede zwischen  $S_0$  und  $S_1$  bzw.  $S_1$  und  $T_1$  sind, desto stärker konkurriert der IC-Prozess bzw. ISC-Prozess mit der Fluoreszenz.

$$\Phi_{fl} = \frac{k_{emis}}{k_{ISC} + k_{IC} + k_{emis}} = \frac{\#emittiertePhotonen}{\#absorbiertePhotonen} \quad (3.1)$$

$$\tau_{fl} = \frac{1}{k_{ISC} + k_{IC} + k_{emis}} \quad (3.2)$$

$$Helligkeit = \Phi_{fl} \cdot \varepsilon_{max} \quad (3.3)$$

$k$  = Raten für jeweilige Übergänge

Auf die unterschiedlichen Arten von Fluorophoren wird in Kapitel 3.1.4 eingegangen.

### 3.1.2 Fernfeld-Fluoreszenzmikroskopie

Im Rahmen dieser Arbeit liegt das Augenmerk der Fluoreszenzmikroskopie auf der Detektion einzelner Fluoreszenzfarbstoffmoleküle.

Obwohl die ersten fluoreszenzmikroskopischen Bilder schon im frühen 20. Jahrhundert gemacht wurden, hielt die Fluoreszenzmikroskopie erst vor rund 30 Jahren massiv Einzug in viele Bereiche der Naturwissenschaften. Dies basierte auf der Pionierarbeit, die von Mörner [1] und Orrit [2] auf dem Bereich der Einzelmoleküldetektion in den frühen 90er Jahren geleistet wurde. Fluoreszenzmikroskopie ist eine Spezialform der Lichtmikroskopie, bei der fluoreszenzmarkierte Objekte abgebildet werden. Somit wirkt das Fluoreszenzlicht als kontrastgebend. Fernfeldoptische Techniken sind die am weitesten verbreiteten Vertreter der Fluoreszenzmikroskopie. In Abbildung 3.2 a ist ein konventionelles fernfeldoptisches Fluoreszenzmikroskop in vereinfachter Form abgebildet. Es handelt sich dabei um ein inverses Mikroskop mit Epi-Beleuchtung. Invers bedeutet, dass das Objektiv sich unterhalb der Probe befindet. Epi-Beleuchtung bedeutet, dass sowohl die Anregung als auch die Emission von der gleichen Probenseite erfolgen. Die naturgemäß vorhandene

Rot-Verschiebung des Fluoreszenzlichtes gegenüber dem Anregungslicht wird gezielt ausgenutzt, um die Emission mittels eines dichroitischen Spiegels von dem Anregungslicht zu trennen. Zu den populärsten fernfeldoptischen Techniken gehören unter anderen Weitfeld- und konfokale Fluoreszenzmikroskopie (s. Abbildung 3.2 b-c).

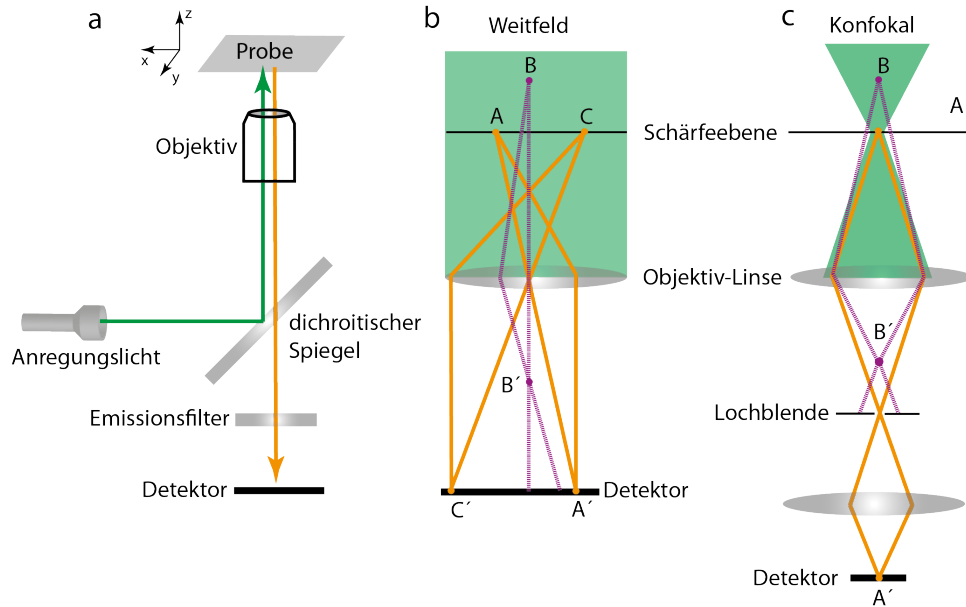


Abbildung 3.2: (a) Ein allgemeiner Aufbau eines inversen Fluoreszenzmikroskops mit Epi-Beleuchtung. Vereinfachte schematische Darstellung eines Weitfeld- (b) und eines konfokalen (c) Fluoreszenzmikroskops. Die Probenpunkte A bzw. C befinden sich in der Schärfenebene des Objektivs, der Punkt B ist dagegen außerhalb der Schärfenebene. In der Weitfeldkonfiguration tragen die Abbildungen aller drei Punkte zur Bildentstehung bei. Im konfokalen Mikroskopaufbau werden dagegen alle Fluoreszenzsignale außerhalb der Schärfenebene weitgehend durch eine Lochblende eliminiert, was zu einem besseren Signal-Rausch-Verhältnis führt.

Der entscheidende Unterschied zwischen ihnen besteht hauptsächlich in der Ausleuchtung der Probe. In der Weitfeldmikroskopie werden alle Bildpunkte innerhalb eines Probenbereichs mit einem parallelen Anregungslicht entlang der optischen z-Achse ausgeleuchtet und gleichzeitig detektiert (z.B. mit einer CCD-Kamera, engl. charge-coupled device). Je nach Belichtungsdauer des Detektors (Integrationszeit) entsteht so ein zweidimensionales Weitfeldbild der Probe. Der Nachteil dabei ist, dass auch das Fluoreszenzlicht der Moleküle detektiert wird, die sich außerhalb der Schärfenebene befinden, was das Signal-Rausch-Verhältnis deutlich verschlechtert. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie ist eine sogenannte punktweise messende Methode. Dabei wird die Probe mit einem fokussierten Anregungslichtstrahl (Anregungsfokus) ausgeleuchtet und Pixel für Pixel abgerastert. Eine Lochblende im Detektionskanal sorgt dafür, dass das störende Signal außerhalb der Schärfenebene weitgehend blockiert wird. Aus diesem Grunde hat ein konfokales Mikro-

skop ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis.

Um das Signal-Rausch-Verhältnis eines Epi-Weitfeldmikroskops zu verbessern, wurde die sogenannte interne Totalreflexions-Fluoreszenzmikroskopie (engl. total internal reflection fluorescence microscopy, TIRF) entwickelt (s. Abbildung 3.3).

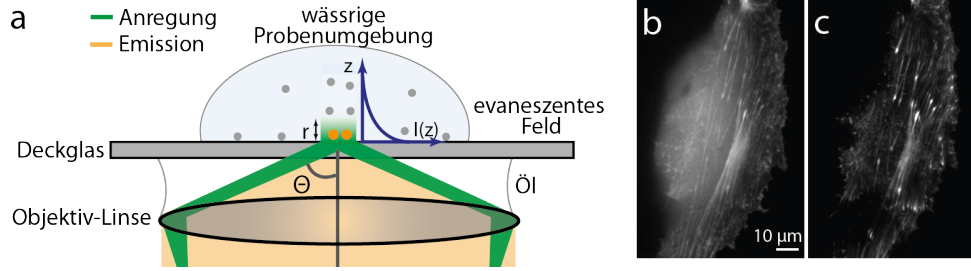


Abbildung 3.3: (a) Schematische Darstellung der Anregung unter totaler interner Reflexion (TIRF), die eine Spezialform der Weitfeldmikroskopie ist. Vergleich der Fluoreszenzbilder der konventionellen (b) Weitfeld- und (c) TIRF-Mikroskopie. Abgebildet sind fluoreszenzmarkierte Aktinfilamente einer MDCK-Zelle (engl. Madin-Darby canine kidney) [14].

Dabei wird nicht die gesamte Probe mit wässriger Umgebung in z-Richtung ausgeleuchtet, sondern nur wenige hundert Nanometer des deckglasnahen Bereichs (s. Abbildung 3.3 a). Totale interne Reflexion ist ein physikalisches Phänomen, das in Abhängigkeit vom Einfallswinkel ( $\theta$ ) des Lichtstrahls im Grenzbereich zweier transparenter Medien unterschiedlicher optischer Dichte auftritt (z.B. Glas/Wasser). Hierfür muss der Anregungslichtstrahl unter einem flachen Winkel  $\theta$ , der größer ist als der sogenannte kritische Winkel  $\theta_c$  (Glas/Wasser) =  $61^\circ$ , ins Mikroskop bzw. am Rande des Objektivs eingekoppelt werden (s. Gleichung 3.4). Dies wird durch den Einsatz eines Objektivs mit hoher numerischer Apertur  $NA \geq 1,4$  ermöglicht. An der Grenze zwischen Deckglas und Probe im wässrigen Medium wird das einfallende Licht nahezu vollständig ins Ausgangsmedium (Glas) zurückreflektiert. Dabei entsteht im Grenzbereich ein evaneszentes Lichtfeld, das sich ins optisch dünnere Medium (Probe) ausbreitet. Die Intensität  $I(z)$  des evaneszenten Lichtfelds nimmt dabei exponentiell in z-Richtung ab (s. Gleichung 3.5). Mit steigendem Einfallswinkel wird die Eindringtiefe  $r$  reduziert, wobei mit steigender Wellenlänge  $r$  dagegen erhöht wird (s. Gleichung 3.6). Die Eindringtiefe des Anregungslichtes in die Probe hinein kann somit normalerweise auf ca. 60 - 150 nm minimiert werden. In dieser TIRF-Konstellation kann daher die Probenschicht direkt hinter dem Deckglas untersucht werden, ohne dass dabei störende Hintergrundsignale aus höher liegenden Bereichen der Probe mitdetektiert werden.

Somit eignet sich TIRF-Mikroskopie hervorragend für die Untersuchung von beispielswei-

se zellulären Prozessen nahe der Plasmamembran [14].

$$\theta_c = \arcsin \left( \frac{n_{\text{wasser}}}{n_{\text{glas}}} \right) \quad (3.4)$$

$$I(z) = I_0 e^{\frac{-z}{r}} \quad (3.5)$$

$$r = \frac{\lambda}{4\pi \sqrt{n_{\text{glas}}^2 \sin^2 \theta - n_{\text{wasser}}^2}} \quad (3.6)$$

- $\lambda$  = *Anregungswellenlänge*
- $n$  = *Brechungsindex des jeweiligen Mediums*
- $\theta_c$  = *Kritischer Winkel*
- $I_0$  = *Anfangsintensität des evaneszenten Lichtfeldes*

### 3.1.3 Einzelmoleküldetektion

Das Fluoreszenzlicht ist von der Intensität her deutlich schwächer als das Anregungslicht. Daher besteht die besondere experimentelle Herausforderung der Einzelmolekülmikroskopie darin, das schwache Fluoreszenzlicht einzelner Moleküle vom Rauschen zu unterscheiden. Zum Bildrauschen trägt das sogenannte Schrotrauschen (engl. shot noise) bei [15]. Ergänzend dazu wird das Bildrauschen in Form von Hintergrundrauschen durch Streuprozesse des Anregungslichtes, fluoreszierende Verunreinigungen, Fluoreszenz der Moleküle außerhalb der Fokusebene sowie Ausleseprozesse des Signals am Detektor ausgelöst [15]. Das Schrotrauschen hat einen besonderen Stellenwert, da es sich durch jegliche Optimierung von Detektoren und optischen Elementen der Mikroskope nicht beeinflussen lässt. Es tritt immer beim Messen von Lichtintensitäten auf und gilt als Konsequenz der stochastischen und diskreten Natur der Photonenemission. Shot noise verursacht zeitliche Schwankungen der Lichtintensität innerhalb der Pixel, auf denen ein Fluorophor beim Aufnehmen abgebildet wird. Das Schrotrauschen weist eine Poisson-Verteilung auf. Dessen Standardabweichung ist proportional zur Quadratwurzel der einfallenden mittleren Lichtintensität, wobei die Signalamplitude direkt proportional zur Lichtintensität ( $N$ ) bzw. Photonenzahl

ist. Das Signal-Rausch-Verhältnis nimmt daher mit steigender Lichtintensität zu (s. Gleichung 3.7). Dies hat zur Folge, dass in der Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie ein Mindestmaß an Fluoreszenzintensität (Belichtungszeit) vonnöten ist.

$$SNR = \frac{N}{\sqrt{N}} = \sqrt{N} \quad (3.7)$$

$SNR$  = *Signal-Rausch-Verhältnis*

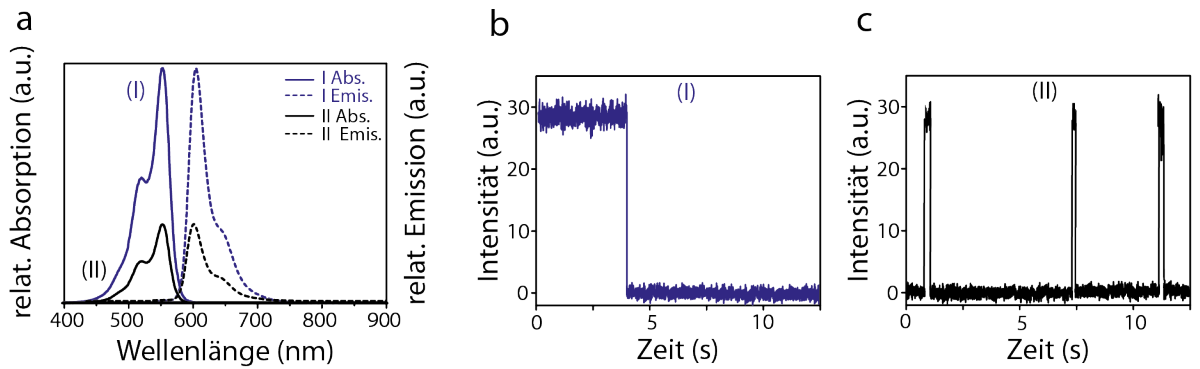


Abbildung 3.4: Vergleich zwischen Ensemble- und Einzelmolekülmessungen für photophysikalische Untersuchungen fluoreszierender Farbstoffmoleküle. (a) Ensemble-Messungen in Form von Absorptions- und Emissionsspektren einer wässrigen Lösung eines Fluoreszenzfarbstoffs gleicher Konzentration, der in zwei Formen (I, II) je nach Pufferbedingungen vorliegen kann. (b-c) Einzelmolekülmessungen liefern zeitlichen Fluoreszenzintensitätsverlauf (sogenannte Spur) der entsprechenden Farbstoffmolekülformen. Form (I) weist ein stabiles Fluoreszenzsignal auf, bis sie nach ca. 4 s photoinduziert zerstört wird. Form (II) weist ein fluktuierendes Fluoreszenzsignal in Form von An- und Auszuständen auf. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität der Form II in (a) ist auf das aufgetretene Blinkverhalten der Moleküle zurückzuführen, was anhand der Emissionsspektren kaum zu erschließen ist. Die aufgeführten Daten sind überwiegend hypothetisch und orientieren sich am Beispiel spontan blinkender Si-Rhodamin-Farbstoffe [16].

Die wichtigsten Anforderungen für die Detektion auf Einzelmolekülniveau bestehen im Einsatz von hochwertigen optischen Bauteilen wie z.B. von einem dichroitischen Spiegel, einem Emissionsfilter, einem Objektiv mit hoher numerischer Apertur sowie von einem Einzelphotonen-empfindlichen Detektor mit niedrigem Rauschpegel (z.B. EMCCD-Kamera, engl. electron multiplying charge-coupled device bzw. APD, engl. avalanche photodiode). Des Weiteren ist auch eine starke Verdünnung der Fluorophorlösung (ca.  $10^{-10}$  M) notwendig. Fluoreszenzbasierte Untersuchungen auf Einzelmolekülniveau haben zahlreiche Vorteile, da in Ensemblemessungen viele molekulare Parameter infolge von

Mittelungsprozessen verborgen bleiben oder unvollständig aufgeklärt werden [17]. Einzelmolekülmessungen liefern in den meisten Fällen eine Verteilung der Charakteristika anstatt eines gemittelten Wertes. Eine präzise Echtzeit-Beobachtung einzelner Moleküle ermöglicht die Identifizierung von unterschiedlichen Subpopulationen (z.B. durch Konformationsänderungen), Positionsbestimmung der Moleküle mit Nanometer-Präzision (s. Kapitel 3.2), Untersuchungen von Diffusions- und Transportprozessen [18] sowie von photophysikalischen Vorgängen fluoreszierender Farbstoffmoleküle [3, 4] (s. Abbildung 3.4). Eine ständige Entwicklung und Optimierung von Laser- und Detektortechnologien sowie von automatisierten kommerziell erhältlichen Mikroskopsystemen führte dazu, dass Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie zu einer Routinetechnik insbesondere in biochemischen, medizinischen und biophysikalischen Teildisziplinen wurde.



### 3.1.4 Fluorophorklassen

Fluorophore können sehr unterschiedlichen Ursprungs sein, und zwar synthetisch anorganischen, organischen und biologischen. Der ersten Kategorie, die im Rahmen dieser Arbeit kaum eine Rolle spielt, gehören z.B. nanoskopische Materialstrukturen aus Halbleitermaterial (Quantenpunkte) oder Diamanten an. Zu der zweiten Gruppe gehören meistens relativ kleine synthetische organische Farbstoffe, die ein planares konjugiertes  $\pi$ -Elektronensystem meistens mit aromatischen Gruppen aufweisen. Bei der dritten Farbstoffklasse handelt es sich z.B. um Proteine mit aromatischen Aminosäuren (z.B. Tryptophan) und viel häufiger um fluoreszierende Proteine, die in ihrem Inneren ein Fluorophorzentrum tragen. Es gibt auch zahlreiche intrazelluläre Stoffe wie z.B. Vitamine ( $B_2$ ,  $A_1$ ), die besonders im kurzwelligeren sichtbaren Bereich autofluoreszent sind.

**3.1.4.1 Organische Fluoreszenzfarbstoffe** Der Schwerpunkt dieses Unterkapitels liegt auf den organischen Fluoreszenzfarbstoffen [19]. Mit dem Einzug der Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie in den frühen 90er Jahren gewannen organische fluoreszierende Farbstoffe und deren Eigenschaften zunehmend an Bedeutung. Grob gibt es zwei Farbstoffklassen, die in den fluoreszenzbasierten Anwendungen am meisten eingesetzt werden. Dabei handelt es sich um Farbstoffe mit Xanthen- und Polymethin-Grundstrukturen [19] (s. Abbildung 3.5). Die spektroskopischen Eigenschaften der ersten Xanthen-basierten Farbstoffe befanden sich im kurzwelligen sichtbaren elektromagnetischen Bereich (z.B. Rhodamin 110,  $\lambda_{abs/max} = 497$  nm,  $\lambda_{emis/max} = 520$  nm,  $\Phi_{fl} = 0,9$ ). Sie weisen zwar eine hohe strukturelle Rigidität und somit eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute sowie photochemische Stabilität auf, für biologische Zwecke sind aber häufiger Fluoreszenzfarbstoffe im langwelligen Bereich von Vorteil, optimal Absorptionsmaximum oberhalb von ca. 600 nm. Der Fluoreszenzhintergrund ist besonders stark im blauen Bereich aufgrund der Autofluoreszenz der meisten biologischen Proben (s.o.) sowie aufgrund der  $1/\lambda^4$ -Abhängigkeit der Effizienz der Lichtstreuung (z.B. Rayleigh-Streuung) von der Anregungswellenlänge ( $\lambda$ ). Eine der Möglichkeiten, die spektroskopischen Eigenschaften Xanthen-basierten zum langwelligeren Bereich zu verschieben, besteht in der Alkylierung der Aminogruppen. Diese chemische Modifikation führt z.B. zu Atto532 ( $\lambda_{abs/max} = 532$  nm,  $\lambda_{emis/max} = 552$  nm,  $\Phi_{fl} = 0,9$ ) und zu einem Farbstoff mit viergliedrigen Azetidin-Ringen der Aminogruppen ( $\lambda_{abs/max} = 549$  nm,  $\lambda_{emis/max} = 571$  nm,  $\Phi_{fl} = 0,9$ ). Wird der zentrale Kohlenstoff durch ein Stickstoffatom ersetzt, führt es zu einer signifikanten Rotverschiebung.

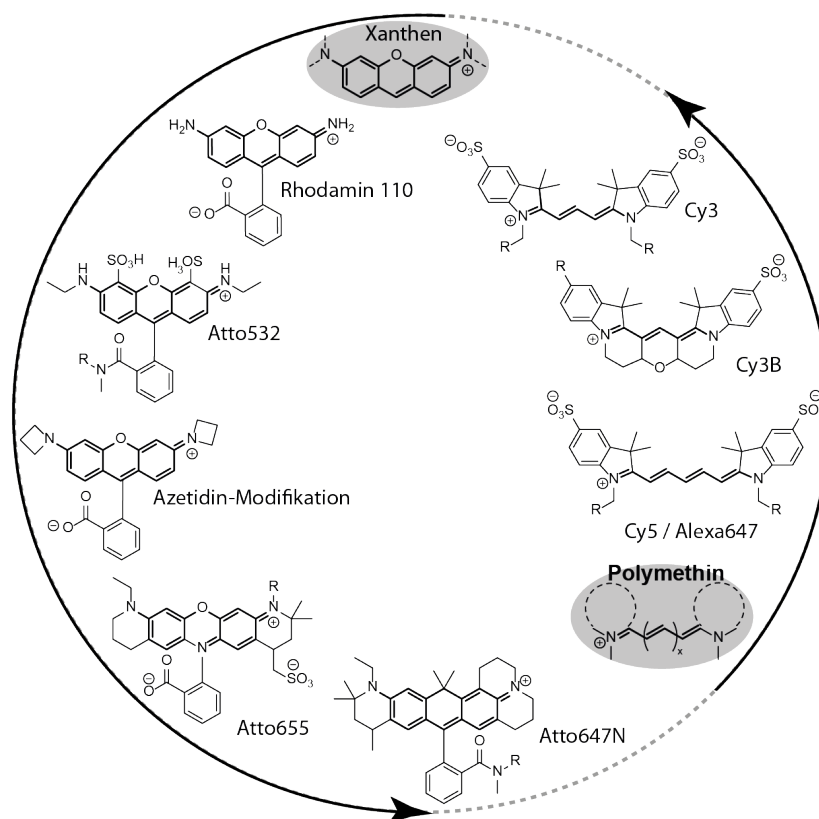


Abbildung 3.5: Chemische Strukturen der wichtigsten synthetischen organischen Fluoreszenzfarbstoffe mit Xanthen- und Polymethin-Grundstrukturen

Diese Farbstoffklasse wird als Oxazine bezeichnet (Atto655:  $\lambda_{abs/max} = 663$  nm,  $\lambda_{emis/max} = 680$  nm,  $\Phi_{fl} = 0,3$ ). Auch Rhodamine mit alkylierten Aminogruppen sowie einem zentralen Kohlenstoffatom anstatt des Stickstoffatoms, sogenannte Carborhodamine, sind stark rotverschoben (Atto647N:  $\lambda_{abs/max} = 646$  nm,  $\lambda_{emis/max} = 664$  nm,  $\Phi_{fl} = 0,65$ ). Eine weitere Farbstoffgruppe sind Polymethinfarbstoffe, die auch als Cyanine bezeichnet werden. Die bekanntesten Vertreter dieser Klasse sind Indocarbocyanine, bei denen zwei Indolgruppen über eine Abfolge von Methingruppen miteinander verbunden sind. Längere Polymethingruppen weisen rotverschobene Absorptions- und Emissionsspektren auf (Cy3 vs. Cy5, s. Abbildung 3.5). Diese Abhängigkeit lässt sich analog zur Modellvorstellung des linearen Potentialtopfes veranschaulichen. Cyanin-Farbstoffe gelten strukturell als weniger stabil z.B. aufgrund von cis-trans-Photoisomerisierung und sind daher vielen Xanthen-basierten Farbstoffen in ihren photophysikalischen Eigenschaften unterlegen (niedrige Fluoreszenzquantenausbeute und Lebensdauer, schnelles Photobleichen). Wird nun die Polymethinkette durch zusätzliche Ringstrukturen verbrückt wie im Falle von

Cy3B, erhöht sich mit der strukturellen auch die photophysikalische Stabilität (Cy3:  $\Phi_{fl} = 0,1$ ,  $\tau_{fl} = 0,2$  ns; Cy3B:  $\Phi_{fl} = 0,73$ ,  $\tau_{fl} = 2,4$  ns) [20]. Sowohl bei den Xanthen- als auch bei Polymethin-Farbstoffen wird die Wasserlöslichkeit durch zusätzliche Sulfonsäuregruppen erhöht, was gleichzeitig die Aggregationsneigung der Farbstoffmoleküle herabsetzt.

**3.1.4.2 Fluoreszierende Proteine** Zu der Fluorophorgruppe biologischen Ursprungs gehören fluoreszierende Proteine (FP), die in den biolumineszierenden Meeresorganismen vorkommen. Das grün fluoreszierende Protein (Wildtyp GFP, wtGFP) wurde in den 60er Jahren von Osamu Shimomura als das erste fluoreszierende Protein in der Quallen *Aequorea victoria* entdeckt und isoliert. Durch die fortschreitende Entwicklung der biotechnologischen Methoden Anfang der 90er Jahre rückte GFP immer mehr ins Blickfeld der Wissenschaftler. Seit der erstmaligen wtGFP-Klonierung (1992) [21] sowie seit der Implementierung von wtGFP als fluoreszierender Marker in lebenden Zellen (1994) [22] wurden fluoreszierende Proteine zu einem wichtigen Instrument der Molekularbiologie. 1996 gelang die kristallographische Strukturaufklärung von wtGFP [23, 24]. Es besteht aus 238 Aminosäuren und weist eine zylinderförmige Struktur (ca.  $3 \times 4$  nm<sup>2</sup>) auf, die aus 11 antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern und einer  $\alpha$ -Helix besteht (s. Abbildung 3.6). Das C- und N-Ende befinden sich auf der gleichen Seite oberhalb der Zylinder-Struktur. Der Fluorophor befindet sich in der Mitte der  $\alpha$ -Helix, die wiederum mittig durch die Zylinder-Struktur verläuft. Nach der Proteinfaltung von wtGFP befinden sich drei Aminosäuren Ser65-Tyr66-Gly67 in räumlicher Nähe, die durch chemische Reaktionen ein Fluorophorzentrum (4-(p-Hydroxybenzyliden)-Imidazolidin-5-on) bilden. Im Detail erfolgt dies infolge eines nukleophilen Angriffs der Amidgruppe des Gly67 und anschließender Dehydratation sowie Oxidationsreaktion der  $\alpha$ - $\beta$ -Bindung des Tyr66 durch den molekularen Sauerstoff [25] (s. Abbildung 3.6 b). Diese Fluorophorbildung läuft somit autokatalytisch unter Anwesenheit von molekularem Sauerstoff und somit ohne Beteiligung *Aequorea victoria*-spezifischer Kofaktoren oder Enzyme ab. Es gibt aber auch Hinweise, dass der Oxidationsschritt vor der Dehydratation in Reihenfolge der Fluorophorbildung stattfindet [25]. Zudem benötigt wtGFP auch keine weiteren Substrate, damit das gebildete Fluorophor nach der Anregung fluoreszieren kann. Dank seiner Kompaktheit ist wtGFP strukturell relativ stabil und hält hohen Temperaturen (bis zu 65 °C) sowie den meisten Proteasen stand [26]. Außerdem bleibt es über einen großen pH-Bereich (pH 6-10) strukturell stabil [27]. Interessanterweise weist wtGFP zwei Absorptionsmaxima, aber nur ein Emissionsmaximum [22] auf (s. Abbildung 3.7). Das ist darauf zurückzuführen, dass das Fluorophorzentrum in der protonierten (Tyr66-OH/ $\lambda_{abs/max} = 395$  nm) und

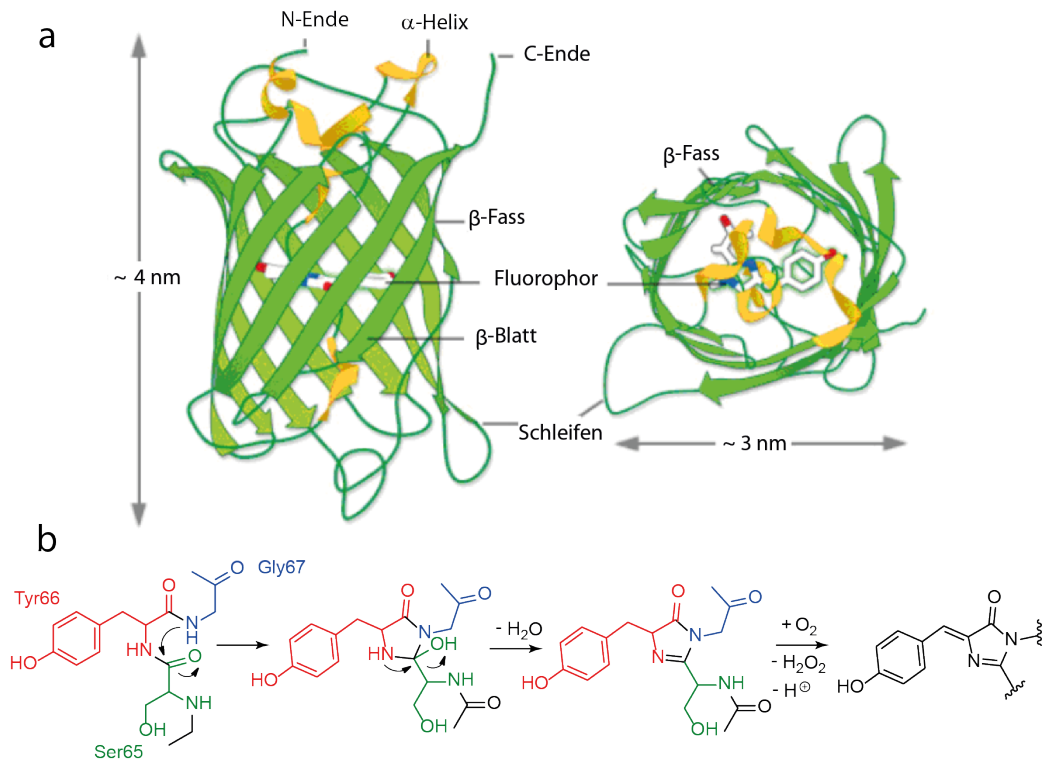


Abbildung 3.6: (a) 3D-Proteinstruktur von Aequorea victoria wtGFP [28], (b) Autokatalytische Bildung des Fluorophorzentrums im wtGFP infolge einer post-translationalen Zyklisierungsreaktion im Tripeptid (Ser65-Tyr66-Gly67).

deprotonierten ( $\text{Tyr66-O}^-/\lambda_{\text{abs}/\text{max}} = 470$  nm) Form absorbieren kann, wobei die angeregte deprotonierte Form der einzige fluoreszierende Zustand ( $\lambda_{\text{emis}/\text{max}} = 509$  nm) ist. Durch Anregung von wtGFP in Hydroxy-Form wird die Acidität des Fluorophors erhöht, so dass die fluoreszierende Enolat-Form gebildet wird [29]. Die fassförmige umhüllende Proteinstruktur hat eine stabilisierende Wirkung auf das Fluorophorzentrum, denn kleine Proteinfragmente, die das Fluorophor enthalten, sind fluoreszenzinaktiv [26].

Um die photophysikalischen Eigenschaften von wtGFP wie z.B. geringe Photostabilität, Helligkeit und langsame Proteinfaltung sowie post-translationalen Zyklisierungsreaktion zu optimieren und spektral zu erweitern, wurden zahlreiche wtGFP-Variationen durch Mutagenese der an der Fluorophorbildung beteiligten Aminosäuren (Ser65-Tyr66-Gly67) oder der in räumlicher Umgebung zum Fluorophor befindlichen Aminosäuren entwickelt. So entstanden EGFP (E/enhanced) sowie FPs mit blau- rotverschobenen Spektraleigenschaften (blue, cyan, yellow fluorescent proteins: BFP, CFP, YFP), s. Abbildung 3.8. Darüber hinaus wurden rote FPs in anderen Meerlebewesen wie in Korallen (z.B. dsRED) gefunden [30, 31]. EGFP weist zwei entscheidende Mutationen (Phe64Leu, Ser65Thr) auf [33]. Zum

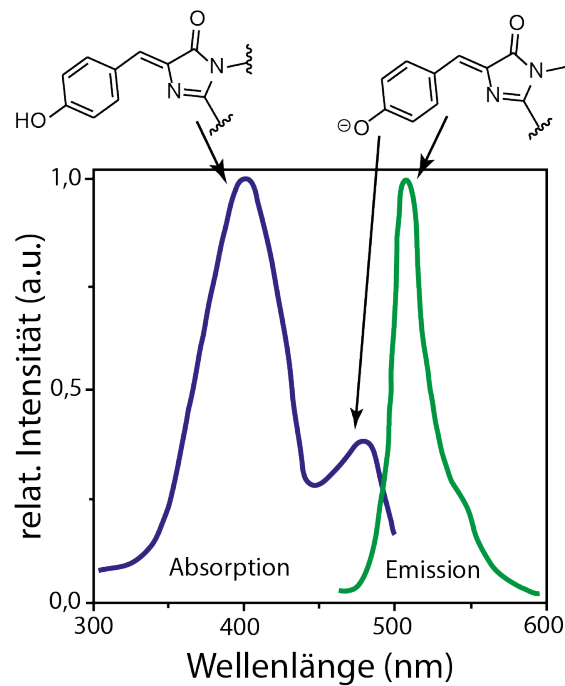


Abbildung 3.7: Absorptions- und Emissionsspektrum von wtGFP [22] mit den Absorptionsmaxima bei 395/475 nm sowie Emissionsmaximum bei 508 nm.

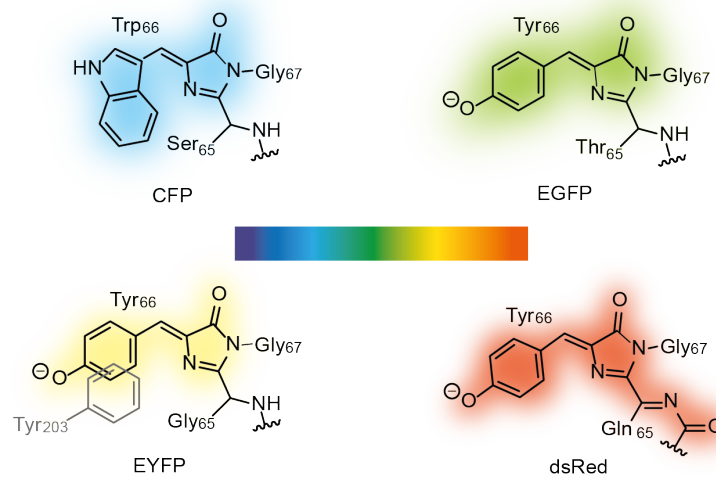
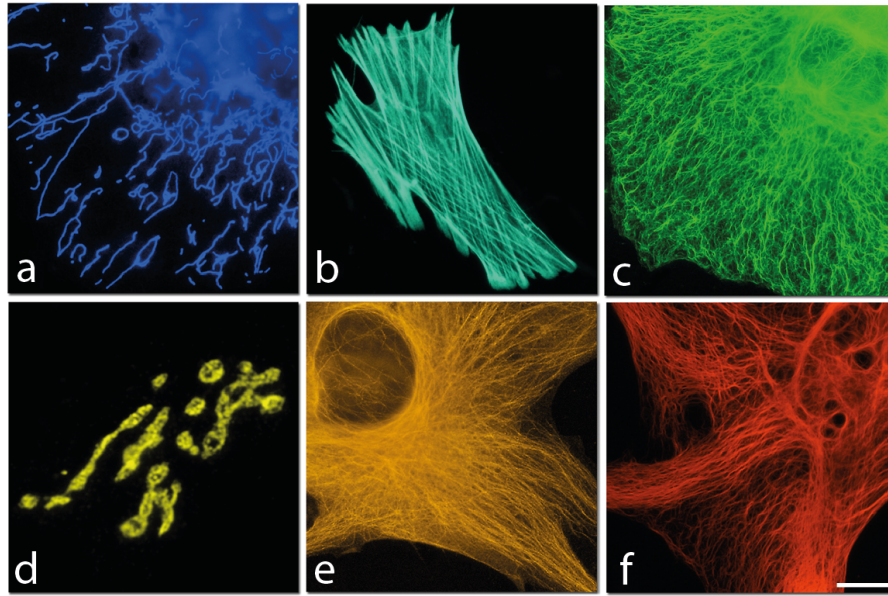


Abbildung 3.8: Beispiele von Fluorophorzentren von spektral unterschiedlichen FPs [32].

einen führt die Mutation Phe64Leu dazu, dass die Proteinfaltung und Fluorophorbildung bei EGFP deutlich schneller erfolgt als bei wtGFP. Dadurch können biologische Prozesse in Zellen zu einem früheren Zeitpunkt verfolgt werden. Zum anderen ist EGFP auch heller und photostabiler als das wtGFP. Diese Eigenschaft ist auf die Mutation Ser65Thr zurückzuführen, da dadurch die anionische Form des Fluorophors in Tyr66 mit dem Absorptions-

maximum bei 488 nm unter physiologischen Bedingungen gefördert wird. Die spektroskopischen Eigenschaften bleiben jedoch infolge von Säure-Base-Gleichgewicht vom externen pH-Wert abhängig [34]. Bei gelb fluoreszierenden Proteinen (YFP) spielt die Mutation Thr203Tyr eine tragende Rolle. Thr203 ist zwar nicht direkt an der Fluorophorbildung beteiligt, befindet sich jedoch in räumlicher Nähe zu Tyr66. Wird Thr203 durch die aromatische Aminosäure Tyr ersetzt, wechselwirken beide aromatische Elektronensysteme miteinander. Diese stabilisierende  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung zwischen Tyr203 und Tyr66 führt zu einer Rotverschiebung von Absorptions- und Emissionsspektren (514 nm und 527 nm) [35]. Bei EYFP tragen weitere Mutationen wie Ser65Gly, Val68Leu, Ser72Ala unter anderem dazu bei, dass der  $pK_s$ -Wert des Fluorophors im Vergleich zu wtGFP herabgesenkt wird. Unter physiologischen Bedingungen bleibt das Protolysegleichgewicht bestehen, das zugunsten der anionischen fluoreszierenden Form verschoben wird. Auf Einzelmolekülniveau führt dieser Wechsel zwischen dem fluoreszenzaktiven- und inaktiven Zustand zu einem im Millisekundenbereich zeitlich fluktuierenden Fluoreszenzsignal [36]. Des Weiteren kommt es im Falle von EYFP zu längeren Dunkelzuständen, die nicht mit dem irreversiblen Photobleichen zu verwechseln sind. Durch UV-Bestrahlung wird das EYFP in den fluoreszierenden Zustand zurückgewonnen [37]. Diese beiden letzteren Eigenschaften von EYFP werden häufig in der supraauflösenden Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt (s. Kapitel 3.2.2.2). Der Austausch von Tyr66 durch Trp führt zu einer Blauverschiebung der spektroskopischen Eigenschaften und resultiert das sogenannte cyan fluorescent protein.

Durch endogene Expression des eingefügten FP-Gens in die DNA einer Zelle oder infolge der Fusion des FP-Gens an das Gen des zu untersuchenden Zielproteins erfolgt die genetisch kodierte Fluoreszenzmarkierung (s. Abbildung 3.9). Dadurch werden die mit exogenen Markierungsmethoden verbundenen Probleme wie z.B. Zellpermeabilität und Markierungsspezifität- und Effizienz vermieden [38]. Durch Anwendung verschiedener Fluoreszenzmikroskopiemethoden ermöglichen fluoreszierende Proteine eine nicht-invasive Bildgebung in lebenden Zellen sowie Einblicke in intrazelluläre Prozesse wie z.B. Genexpression, Proteinlokalisierung und Transportprozesse [39, 40]. Auf die Anwendung von FPs in der Superauflösungsfluoreszenzmikroskopie wird näher in Kapitel 3.2.2.2 eingegangen. Durch die Erweiterung der spektralen Bandbreite von FPs wurden zahlreiche neue experimentelle Methoden *in vivo* mit Mehrfarbenmarkierung zugänglich wie z.B. Experimente mit Protein-Kokalisation, Konformationsänderungen sowie molekulare Wechselwirkung via FRET (Förster-Resonanzenergietransfer) [27]. Eine empfindliche Reaktion der Fluoreszenzintensität von einigen FPs auf die Änderungen der pH-Werte oder der Halogenid-



Abbildungung 3.9: (a-f) Weitfeld-Fluoreszenzbilder von subzellulären Strukturen markiert mit unterschiedlichen fluoreszierenden Proteinen. Die Farbgebung der Bilder ist an die Emissionsspektren der verwendeten FPs angepasst: (a) blau-EBFP/Cytochrom-c-Oxidase Enzym in Mitochondrien, (b) cyan-TFP1mFP/Aktin-Filamente (c) grün-mEmeraldFP/Zytokeratin-Intermediärfilamente (d) gelb-mKOFP/Golgi-Apparat (e) orange-TagRFP/ $\alpha$ -Tubulin in Mikrotubuli (f) rot-mCherryFP/Vimentin-Intermediärfilamente [41]. Der Maßstabsbalken beträgt  $10\ \mu\text{m}$ .

konzentrationen macht sie zu optimalen Biosensoren von intrazellulären Milieuveränderungen [40]. Die autarke und Organismen-unabhängige Fähigkeit zur Faltung zur fluoreszierenden Struktur sowie die Möglichkeit, mittels Gentechnik mit beliebigen anderen Zielproteinen fusioniert zu werden, waren entscheidende Faktoren für die rasante Verbreitung von FPs als fluoreszierender Reporter in biochemischen Untersuchungen zahlreicher Lebewesen. Die Nobelpreisverleihung 2008 für die Entdeckung und Erforschung von FPs unterstreicht die Tragweite dieses Forschungsbereichs.

Neben diesen bahnbrechenden Entwicklungen sind jedoch einige Risiken und Limitierungen mit der Verwendung von FPs verbunden. Eine der Limitierungen liegt in der Größe von FPs begründet. Mit einer Länge von ca. 240 Aminosäuren und einer Masse von ca. 30 kDa liegt es nicht weit entfernt von der Größe der meisten zu untersuchenden Zielproteine. FPs als Reporter können somit die Eigenschaften des Fusionsproteins beeinflussen oder gewisse Messergebnisse vortäuschen [38, 42]. Darüber hinaus sind fluoreszierende Proteine recht groß im Vergleich zu synthetischen organischen Fluoreszenzfarbstoffen. Ihre Größe kann sich somit auf die Markierungsdichte limitierend auswirken (s. Nyquist-Kriterium, Kapitel 3.2.2). Der Einsatz von FPs kann auch dadurch limitiert werden, dass FPs un-

tereinander unspezifisch interagieren und sogar stabile Di- oder Multimere bilden können [42]. Das kann zu vorgetäuschten Wechselwirkungen zwischen den markierten Zielproteinen führen [38]. Ergänzend dazu sind die photophysikalischen Eigenschaften der meisten FPs denen organischer Fluorophore deutlich unterlegen. Dies äußert sich in Form von schnellem Photobleichen, niedrigen Extinktionskoeffizienten und Quantenausbeuten [42].



### 3.1.5 Photophysikalische Eigenschaften von Fluorophoren

Der Schwerpunkt dieses Kapitels wird auf die Photophysik organischer Fluorophore gesetzt. Die photophysikalischen Eigenschaften von fluoreszierenden Proteinen lassen sich schlechter verallgemeinern als im Falle von organischen Fluoreszenzfarbstoffen und werden in Kapiteln 3.1.4.2 und 3.2.2.2 erläutert.

Wie es aus dem allgemeinen Jablonski-Diagramm (s. Abbildung 3.1) hervorgeht, lassen sich die photophysikalischen Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe im Wesentlichen durch ein Drei-Zustands-Modell erklären. Es handelt sich dabei um  $S_0$ ,  $S_1$  und  $T_1$ . Zirkuliert ein Fluoreszenzfarbstoffmolekül zwischen  $S_1$  und  $S_0$ , so befindet es sich im Anzustand. Der Übergang zum Triplett führt zu einem Auszustand. Somit lässt sich das Fluoreszenzsignal eines Farbstoffmoleküls durch ein Zwei-Zustands-Modell mit den jeweiligen Übergangsraten  $k_1$  und  $k_0$  beschreiben (s. Abbildung 3.10). Die mittlere Verweildauer im An- sowie Auszustand entspricht dem Kehrwert der entsprechenden Übergangsraten  $k_0$  sowie  $k_1$  (s. Gleichungen 3.8 - 3.9). Die Dauer der An- und Auszustände innerhalb einer Fluoreszenz-Zeit-Spur eines Farbstoffmoleküls ist nach diesem Modell monoexponentiell verteilt (s. Abbildung 3.11).

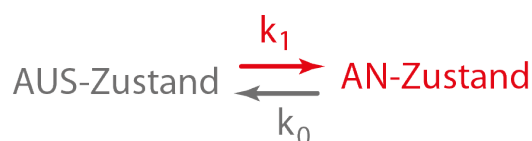


Abbildung 3.10: Zwei-Zustands-Modell eines Fluoreszenzfarbstoffmoleküls, bei dem es zwischen einem hellen und dunklen Zustand mit entsprechenden Übergangsraten ( $k_1$ ,  $k_0$ ) wechselt.

$$\langle t_{ON} \rangle = \frac{1}{k_0} \quad (3.8)$$

$$\langle t_{OFF} \rangle = \frac{1}{k_1} \quad (3.9)$$

Bei dem Auszustand kann es sich auch um einen anderen dunklen Zustand handeln als den Triplett-Zustand (s. Kapitel 3.2.2.1). Je effektiver ein Farbstoffmolekül infolge von Photoanregung zwischen den  $S_0$ - und  $S_1$ -Zuständen unter Emission eines Photons entsprechender Wellenlänge zirkuliert, umso höher ist seine detektierte Fluoreszenzintensität. Die Intensität der aufgenommenen Fluoreszenzspur eines Farbstoffmoleküls korreliert somit

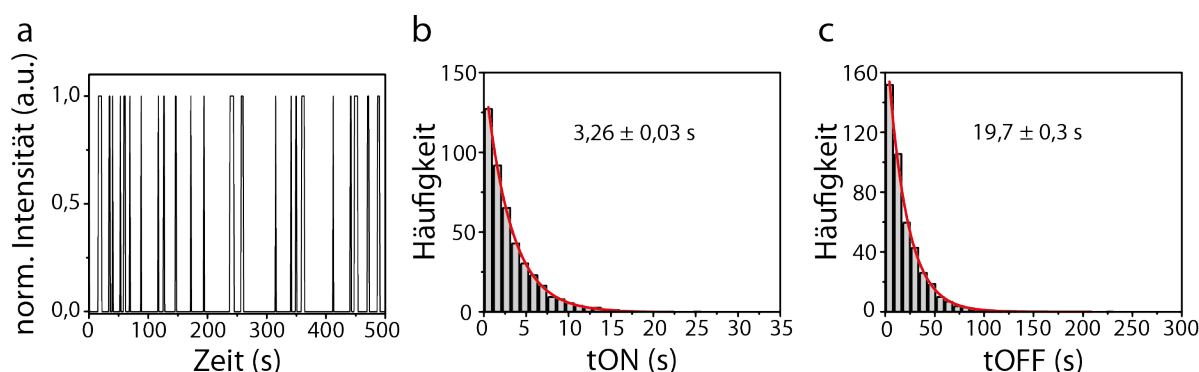


Abbildung 3.11: (a) Eine simulierte idealisierte Fluoreszenz-Zeit-Spur mit einem Zwei-Zustands-Modell und mit einer mittleren Dauer von Anzeiten  $t_{\text{ON}} = 3,3$  s sowie von Auszeiten  $t_{\text{OFF}} = 20$  s. (b-c) Entsprechende Histogramme von An- und Auszeiten; deren monoexponentielle Anpassungen liefern angegebene mittlere An- und Auszeiten ( $3,26 \pm 0,03$  s und  $19,7 \pm 0,3$  s) und stimmen mit den theoretischen Werten sehr gut überein.

mit der Fluoreszenzquantenausbeute. Bei höheren ISC-Raten hat die Lebensdauer von Triplett-Zuständen einen signifikanten Einfluss auf die Fluoreszenzintensität, Photostabilität im Sinne von langsamem Photobleichen und abwesenden Fluktuationen (Blinken). An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass der Begriff Photostabilität in Fachkreisen häufiger in zweierlei Hinsicht benutzt wird, somit wird der Terminus Photostabilität im Rahmen dieser Arbeit mit begleitender Deutung benutzt. Da die Lebensdauer des Triplett-Zustands am längsten ist, wird er als einer der photochemisch reaktivsten Zustände betrachtet. Eines der prominentesten Beispiele dafür liefert die Wechselwirkung mit dem molekularen Sauerstoff, der in wässrigen Medien physikalisch gelöst vorliegt (ca.  $250 \mu\text{M}$  [43]). Der molekulare Sauerstoff hat zwei Wirkungsmechanismen (s. Abbildung 3.12). Zum einen entvölkert er den Triplett-Zustand des Farbstoffs auf photophysikalische Weise [44], analog zu Triplett-Triplett-Annihilation (s. Abbildung 3.17 b [45]) und zum anderen führt dieser Energietransfer zum reaktiven Singulett-Sauerstoff, der mit anderen Farbstoffen, hier z.B. Cyanin-Farbstoffmolekülen eine irreversible chemische Reaktion (z.B. Bildung von Dioxetanen bzw. Carbonyl-Verbindungen) eingehen kann. Dies führt zum sogenannten irreversiblen Photobleichen (s. Abbildung 3.15 a), denn das Farbstoffmolekül kann durch diese chemische Veränderung nicht mehr fluoreszieren. Um das Photobleichen insbesondere von Cyanin-Farbstoffen, die höhere ISC-Raten besitzen, drastisch zu reduzieren, wird in vielen Einzelmolekül-Fluoreszenzexperimenten der physikalisch gelöste Sauerstoff aus dem Messpuffer entzogen. Dies verlängert ungünstigerweise die Triplett-Lebensdauer (Cy5/ca. 100 ms [46] (s. Abbildung 3.15 b), Atto647N/ca. 30 ms [3]) und setzt somit die Helligkeit der Farbstoffe herab. Um das störende Triplett-

Blinken im ms-Bereich infolge des Sauerstoffentzugs zu kompensieren, wird ein anderer Triplett-Quencher (Fänger) zugesetzt [47, 48] (s. Abbildung 3.15 b-c).

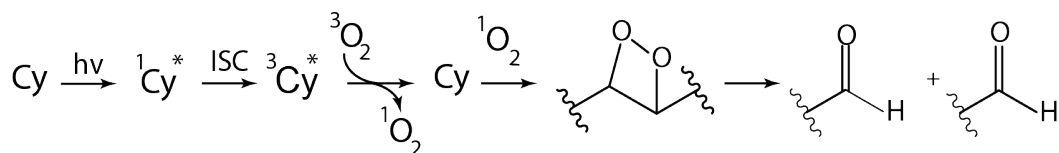


Abbildung 3.12: Mechanismus von Photobleichen am Beispiel eines Cyanin-Farbstoffs (Cy): ein Farbstoffmolekül im Triplett-Zustand ( $^3\text{Cy}^*$ ) wird durch molekularen Triplett-Sauerstoff entvölkert. Dabei wird sehr reaktiver Singulett-Sauerstoff gebildet, der Cyanin-Farbstoffe weiter angreifen und chemisch beispielsweise zu Dioxetanen und Carbonyl-Verbindungen verändern kann [49].

**3.1.5.1 Triplett-Quencher** Hauptsächlich gibt es zwei Arten von Triplett-Quenchern, deren Wirkungsweise photochemisch oder photophysikalisch sein kann. Zunächst wird auf die erste Art eingegangen. Photoinduzierter Elektronentransfer (PET) ist eine der am weitesten verbreiteten Triplett-Quenching-Methoden in der Fluoreszenzmikroskopie. Dabei handelt es sich um ein Redoxsystem (ROXS, engl. reducing and oxidizing system) [3], das den Triplett-Zustand des Fluoreszenzfarbstoffs durch eine aufeinander folgende Redoxreaktion und damit einhergehende ladungsseparierte Radikalzustände (z.B.  $\text{F}^+$ ,  $\text{F}^-$ ) entvölkert (s. Abbildung 3.13). Befindet sich dagegen nur ein Oxidations- oder Reduktionsmittel unter Sauerstoffentzug in der Messlösung anstelle von ROXS, so treten Fluktuationen durch das Radikalblinken im ms-Bereich auf. Dies dient als Nachweis dafür, dass ROXS über ladungsseparierte Radikalzustände agiert. Unter diesen Bedingungen wird auch ein schnelleres Photobleichen beobachtet, was wiederum damit zusammenhängt, dass in Abwesenheit eines geeigneten Redoxpartners langlebige Radikalzustände mit den Reaktionswegen zum Photobleichen zusammenhängen können [3]. Im Gegensatz zum Grundzustand tritt die Redoxaktivität gegenüber ROXS nur infolge der Photoanregung des Fluoreszenzfarbstoffs auf, denn die Redoxpotentiale unterscheiden sich in Abhängigkeit vom elektronischen Zustand. Das Quenching von Triplett-Zuständen *via* Elektronentransfer mit ROXS kann sogar so effektiv und schnell stattfinden, so dass das Triplett-Blinken kaum messbar wird [3].

ROXS hat also eine antiblinkende Wirkung (s. Abbildung 3.15 c). Damit der  $\text{S}_1$ -Zustand durch PET nicht gequencht wird, ist darauf zu achten, dass sich die ROXS-Konzentration im niederen mM-Bereich befindet [47]. Unter ROXS wird auch das Photobleichen deutlich verlangsamt, was auf eine schnelle Überführung der Radikalzustände in den Grundzustand ( $\text{S}_0$ ) zurückzuführen ist. Ascorbinsäure/Methylviologen sowie Trolox/Troloxchinon

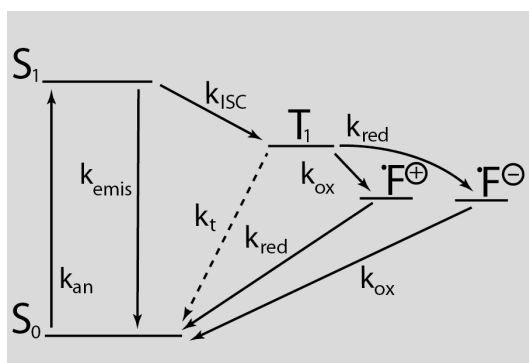


Abbildung 3.13: Jablonski-Diagramm ist mit ROXS-Wirkungsmechanismus ergänzt. Unter Sauerstoffentzug und in Anwesenheit eines geeigneten Redoxpaares wird der Triplett-Zustand durch schnelle aufeinanderfolgende Redoxreaktionen ( $k_{ox}$ ,  $k_{red}$ ) entvölkert, so dass ein stabiles Fluoreszenzsignal mit kaum Triplett-Blinken erhalten wird (s. Abbildung 3.15 c).

sind häufig eingesetzte Redoxpaare fürs ROXS-System, wobei Troloxchinon (engl. troloxquinone, TQ) aus Trolox (TX) unter Einfluss von molekularem Sauerstoff und UV-Licht (300 nm) gebildet wird (s. Abbildung 3.14) [50].

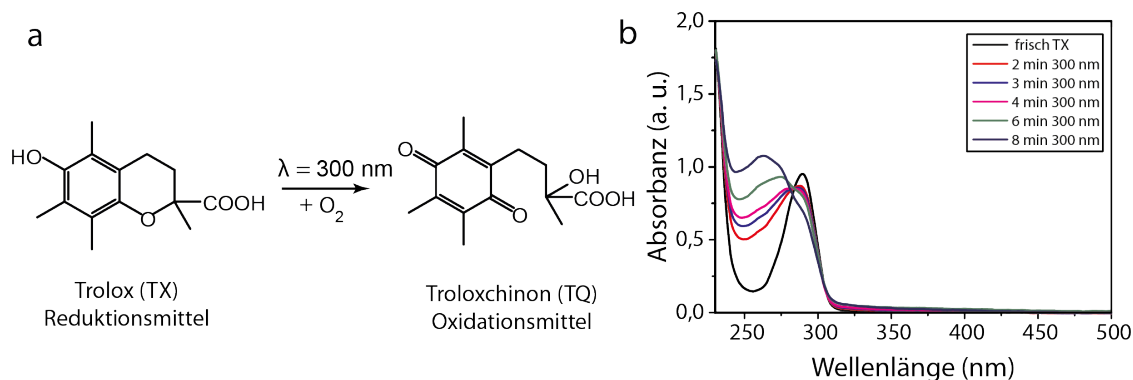


Abbildung 3.14: Umwandlung von Trolox (TX) zu Troloxchinon, engl. troloxquinone (TQ) mithilfe von UV-Licht (ca. 300 nm) und molekularem Sauerstoff. (a) Reaktionsgleichung und (b) Absorptionsspektrum von TX (Maximum bei ca. 290 nm) während dieser Umwandlung zu TQ (Maximum bei ca. 270 nm).

Aufgrund der Instabilität von Ascorbinsäure in wässriger Lösung bei höheren pH-Werten [51], Toxizität sowie 2-fach positiver Ladung von Methylviologen in Kombination mit negativ geladener DNA als Probengerüst (s. Kapitel 3.2.3) ist es vorteilhafter, Trolox/Troloxchinon als ROXS-System zu benutzen. Da das Triplett-Quenching *via* Elektronentransfer und somit diffusionsabhängig stattfindet, muss das Redoxpaar in ausreichender Konzentration in der Messlösung vorliegen (ca. 1-2 mM). Trolox erfüllt auch diese Bedingung, denn es löst sich in ausreichender Menge (ca. 2 mM) in gängigen Puffern. Die antiblin-

kende Wirkung von ROXS funktioniert am besten mit den Fluoreszenzfarbstoffen, deren Radikalzustände energetisch nahe beieinanderliegen (z.B. Cyanine/Alexa647, Carborhodamine/Atto647N, Rhodamine/Atto565). Ist z.B. der reduzierte Radikalzustand deutlich tiefer als der oxidierte Radikalzustand, kann ROXS das Radikalblinken nicht mehr unterdrücken (Oxazine/Atto655).

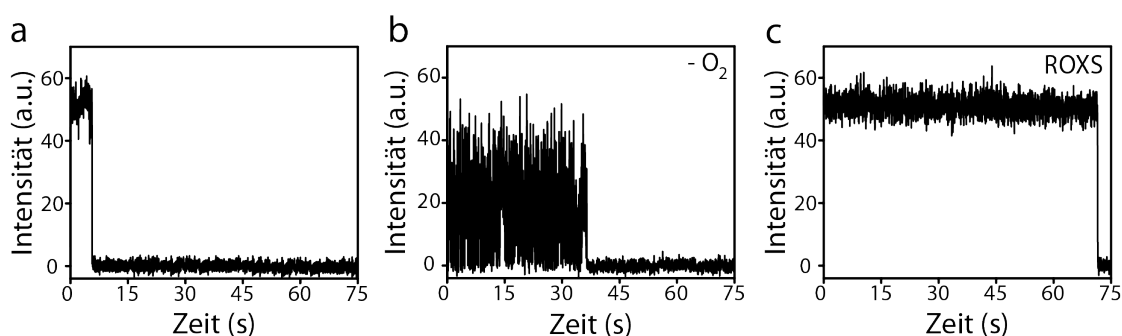


Abbildung 3.15: Photophysikalisches Verhalten von rot-absorbierenden Cyanin-Farbstoffen (Alexa647) unter unterschiedlichen chemischen Bedingungen. Alexa647-Fluoreszenzspur in (a) Tris-Messpuffer ohne jegliche Zusätze mit einem schnellen Photobleichen, (b) unter Sauerstoffentzug und (c) mit ROXS (1 mM Trolox/Troloxchinon)

Aliphatische Thiole (z.B.  $\beta$ -Mercaptoethanol, ME) nehmen eine Sonderstellung im Triplett-Quenching ein [52]. Im klassischen Sinne handelt sich dabei um ein Reduktionsmittel. Das Radikalblinken und Photobleichen wird jedoch im Gegensatz zu z.B. Ascorbinsäure unter Sauerstoffentzug drastisch reduziert (s. Abbildung 3.16). Ihr Wirkungsmechanismus basiert teilweise wie ROXS auf dem photoinduzierten Elektronentransfer, wobei es nur eingeschränkt zu ladungsseparierten Radikalzuständen kommt. ME ist in der Lage, über geminale Rekombination das Elektron zurückzunehmen, bevor es die mit dem Farbstoff gemeinsame Solvatationshülle verlässt [52]. Auf weitere photophysikalische Eigenschaften von Thiolen wird in Kapitel 3.2.2.1 eingegangen.

Cyclooctatetraen (COT) gehört zu den photophysikalischen Triplett-Quenchern. COT ist ein flexibles, cyclisches, nicht-aromatisches Polyen mit vier konjugierten C=C-Doppelbindungen, das den Triplett-Zustand des Fluorophors *via* Triplett-Triplett-Energietransfer (TTE, Abbildung 3.17 a) entvölkert. TTE ist der sogenannte Dexter-Energietransfer [53], der strahlungslos durch einen Elektronenaustausch zwischen zwei Molekülen (Donor-Akzeptor) stattfindet. Dieser Elektronenaustausch ist nur bei sehr kurzen Abständen möglich ( $< 1$  nm): d.h., wenn sich die Molekülorbitale der betreffenden Moleküle durch einen Zusammenstoß überlappen. Für einen effizienten TTE-Prozess muss das Triplett-Energieniveau des Akzeptors um mindestens  $12,5 \text{ kJmol}^{-1}$  tiefer liegen als das des Donors

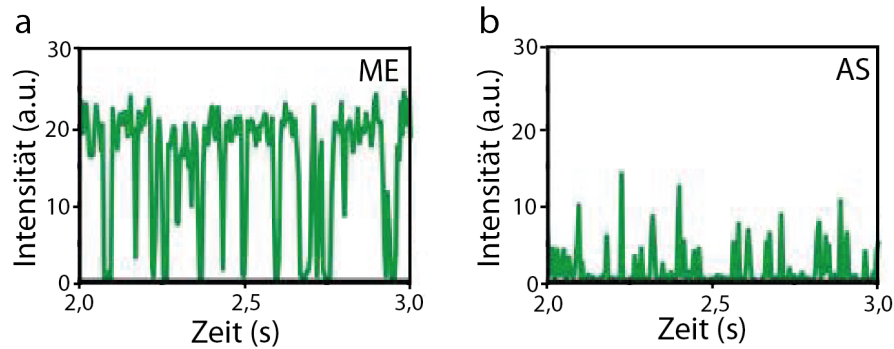


Abbildung 3.16: Unterschiedliche Triplet-Quenching-Wirkungsweisen von Reduktionsmitteln am Beispiel von Alexa568:  $\beta$ -Mercaptoethanol (ME, a) und Ascorbinsäure (AS, b) unter Sauerstoffentzug [52].

[53]. Hinzufügend soll die Lebensdauer des  $T_1$ -Donors möglichst kurz sein, um mögliche Wechselwirkungen wie z.B. mit molekularem Sauerstoff zu minimieren [54]. Diese Kriterien erfüllt COT im weitesten Sinne und gilt es als einer der effektivsten Triplet-Quencher, der früher sehr häufig in Farbstofflasern eingesetzt wurde [54]. COT ist jedoch kein klassischer Triplet-Quencher, denn der energieärmere Triplet-Zustand wird während des TTE-Prozesses infolge der damit einhergehenden stabilisierenden Konformationsänderung zu planarer Geometrie generiert (Abbildung 3.17 c).

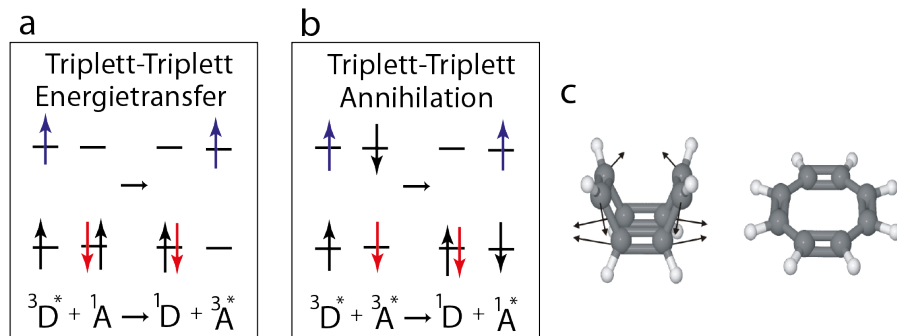


Abbildung 3.17: Schematische Darstellung von Dexter-Energietransfer: (a) Triplet-Triplet-Energietransfer, (b) Triplet-Triplet-Annihilation mit D (Donor) und A (Akzeptor) [45]. (c) Konformationen von COT: Wannenform (links) geht in die planare Form bei Triplet-Triplet-Energietransfer über [54].

### 3.1.6 Beugungsgrenze

In diesem Abschnitt wird in erster Linie die laterale Auflösung der Weitfeldfluoreszenzmikroskopie thematisiert.

Das Licht einer Punktquelle (z.B. fluoreszierendes Molekül) kann auch durch ein fehlerfreies optisches Weitfeldmikroskops nicht auf einen kleinen Punkt in der Bildebene fokussiert werden. Dies liegt daran, dass Lichtbeugung bei der Bildentstehung eine entscheidende Rolle spielt. Das emittierte Licht wird auf einen 3D-Bereich nahe der Bildebene fokussiert. Die Intensitätsverteilung dieses Beugungsmusters wird als Punktabbildungsfunktion bzw. Punktantwort (PSF, engl. point spread funktion) genannt. Die laterale Intensitätsverteilung der PSF in der Bildebene ist in Abbildung 3.18 dargestellt. Das entsprechende Airy-Beugungsmuster wird als Projektion der lateralen PSF innerhalb der Bildebene erhalten und bestehen aus einem zentralen Intensitätsmaximum und konzentrischen Ringen. Diese Symmetrie des Beugungsmusters gilt streng genommen nur für die Emitter, deren Emissionsübergangsdipolmoment entlang der optischen Achse ( $z$ ) orientiert ist. Dies gilt aber auch für die frei rotierenden Emitter, bei denen die Anisotropie aufgrund der schnellen Rotation (in ps-Bereich) aufgehoben wird.

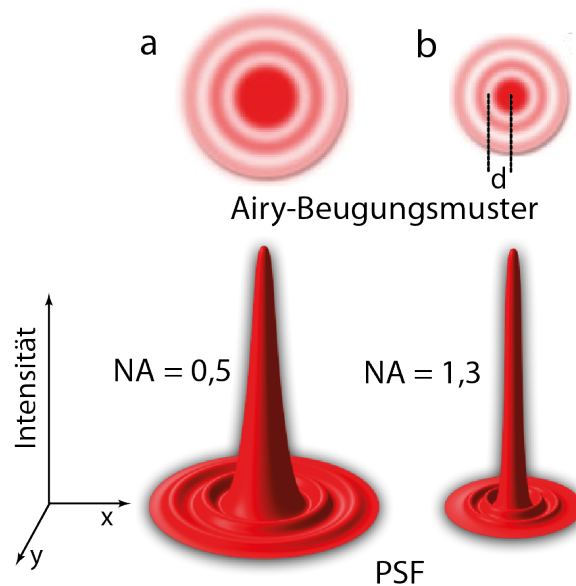


Abbildung 3.18: Punktabbildungsfunktionen (PSF) mit entsprechender Intensitätsverteilung in der  $xy$ -Ebene, wobei die  $z$ -Achse konventionell der optischen Achse entspricht, und dazugehörige Airy-Beugungsmuster eines punktförmigen Emitters in Abhängigkeit von der numerischen Apertur (NA) des Objektivs.  $d$  ist der Abstand zwischen dem ersten Intensitätsmaximum und dem ersten Intensitätsminimum des Airy-Beugungsmusters [55].

Der Abstand  $d$  zwischen dem ersten Intensitätsmaximum und dem ersten Intensitätsminimum des lateralen Airy-Beugungsmusters lässt sich aus der Emissionswellenlänge  $\lambda$  und der numerischen Apertur des Objektivs berechnen (s. Gleichung 3.10).

$$d = \frac{0,61 \cdot \lambda}{n \cdot \sin \alpha} = \frac{0,61 \cdot \lambda}{NA} = 2,77 \cdot \sigma_{PSF} \quad (3.10)$$

$$FWHM = \frac{0,51 \cdot \lambda}{NA} = 2,35 \cdot \sigma_{PSF} \quad (3.11)$$

$FWHM$	=	<i>Halbwertsbreite bzw. engl. full width at half maximum</i>
$n$	=	<i>Brechungsindex des Immersionsmediums</i>
$\alpha$	=	<i>der halbe Öffnungswinkel des Objektivs</i>
$NA$	=	<i>numerische Apertur des Objektivs</i>
$\sigma_{PSF}$	=	<i>Standardabweichung der PSF</i>

Somit sind der Durchmesser des zentralen Airy-Scheibchens und die Halbwertsbreite (engl. full width at half maximum, FWHM) (s. Gleichung 3.11) der PSF immer von der Wellenlänge des emittierten Lichts und der numerischen Apertur des Objektivs abhängig. Das Erscheinen der konzentrischen Ringe ist jedoch nicht immer sichtbar und ist von der Lichtintensität sowie der Detektionssensitivität des jeweiligen Detektors abhängig. Darüber hinaus wird die bestehende Symmetrie der Airy-Beugungsringe beibehalten, wenn ein Emittor außerhalb der Schärfenebene liegt. In diesem Fall wird das Airy-Beugungsmuster breiter. Aufgrund der Lichtbeugung beträgt der Durchmesser des zentralen Airy-Scheibchens mehrere hundert Nanometer, obwohl organische Fluorophore nur wenige Nanometer groß sind. Die Auflösung eines fluoreszenzbasierten Mikroskops wird als der kleinste Abstand zweier Emittoren definiert, bei dem aus den sich überlappenden PSFs die Fluorophore noch als zwei getrennte Objekte zu erkennen sind. Nach dem Rayleigh-Auflösungskriterium wird dieser Abstand zwischen zwei Fluorophoren dann erreicht, wenn das Intensitätsmaximum des Beugungsscheibchens des ersten Fluorophors mit dem Intensitätsminimum des zweiten Fluorophors überlappt (s. Abbildung 3.19). Die laterale Auflösung innerhalb der Bildebene entspricht in der fluoreszenzbasierten Mikroskopie daher genau dem Abstand  $d$  aus Gleichung 3.10. Aus diesem Grunde heraus erscheinen Objekte als zusammenhängender Lichtfleck, deren Abstand zueinander kleiner als die halbe Wellenlänge des emittierten Lichts (ca. 250 - 350 nm) ist.



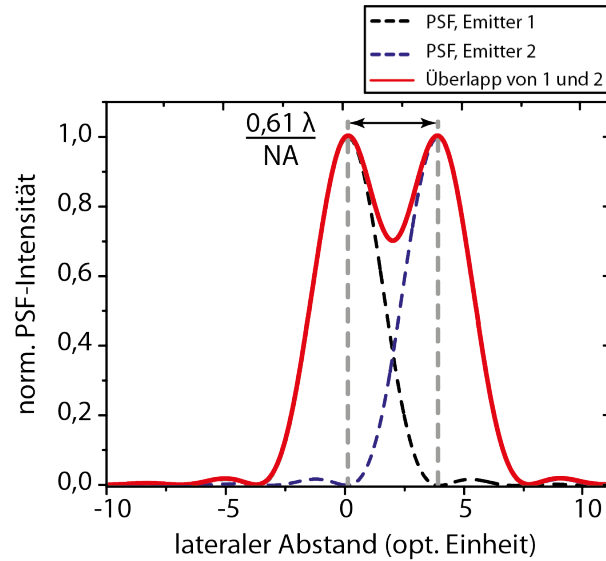


Abbildung 3.19: Das Rayleigh-Auflösungskriterium für zwei punktförmige Emittoren, deren PSFs als Querschnitt durch die Mitte des Airy-Beugungsmusters dargestellt sind. Als Einheit für den lateralen Abstand wird die sogenannte dimensionslose optische Einheit benutzt, um unterschiedliche optische Systeme vergleichbar zu machen. Der Abstand aus dem Rayleigh-Kriterium beträgt ca. 3,8 opt. Einheiten, wobei  $\text{Abstand (opt. Einheiten)} = \text{Abstand (nm)} \cdot 2\pi \text{NA} / \lambda$ .

In der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie unterliegen sowohl der Anregungsfokus als auch der Detektionsfokus der Auflösungsgrenze, wobei die Rolle des Anregungsfokus von entscheidender Bedeutung ist. Die PSF eines Fluoreszenzfarbstoffs kann maßgeblich durch die Breite des Anregungsfokus beeinflusst werden. Die Ausdehnung des Laserfokus kann durch die Lichtbeugung nicht kleiner sein als die halbe Wellenlänge des Anregungslichtes. Darüber hinaus hat das Signal-Rausch-Verhältnis und somit der Kontrast zwischen hellen und dunklen Bereichen einen nicht unerheblichen Einfluss auf das theoretisch maximale Auflösungsvermögen eines Mikroskops. Ein Molekül muss genügend Licht emittieren, um sich ausreichend vom Hintergrundrauschen abheben zu können. Auch die Pixelgröße soll unterhalb der Beugungsgrenze liegen, um das theoretische Auflösungsvermögen nicht weiter zu beeinträchtigen. Nach dem Nyquist-Kriterium soll die Pixelgröße höchstens die Hälfte der Größe des kleinsten aufzulösenden Objekts betragen. Im Idealfall sollte die PSF eines Farbstoffs auf 3-4 Pixeln verteilt sein. Im Allgemeinen tragen kürzere Wellenlängen und Objektive mit hoher numerischer Apertur zur Verbesserung der beugungsbegrenzten Auflösung sowohl in der konfokalen als auch in der Weitfeldmikroskopie bei. Dennoch liegt die Größenordnung von vielen wissenschaftsrelevanten Komponenten einer lebenden Zelle (z.B. Proteine bzw. Proteinkomplexe) im 1-2-stelligen Nanometerbereich und unterliegt dementsprechend leider der bestehenden Beugungsgrenze.

## 3.2 Superauflösende Fluoreszenzmikroskopie

In diesem Kapitel werden die wichtigsten Konzepte der suprauflösenden Fluoreszenzmikroskopie beschrieben, wobei ein besonderes Augenmerk auf der lokalisierungsbasierten Methode liegt.

Bei den sogenannten fluoreszenzbasierten Superauflösungsmikroskopie-Techniken handelt es sich um lichtmikroskopische Verfahren, die die naturgegebene Auflösungsgrenze nicht direkt brechen, sondern geschickt umgehen können. Der Unterschied zwischen den populärsten suprauflösenden Methoden besteht darin, ob ein stochastisches oder ortsspezifisches Schalten der Fluorophore notwendig ist. Im Regelfall führen diese Techniken zu einer verbesserten Auflösung von ca. 20 nm.

### 3.2.1 STED

Zu den ersten entwickelten Superauflösungsmethoden gehört die sogenannte STED-Mikroskopie (engl. stimulated emission depletion), die von Stefan Hell theoretisch beschrieben (1994) [56] und praktisch realisiert (1999) [6] wurde. STED-Mikroskopie basiert auf einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop und dem Phänomen der stimulierten Lichtemission, die maßgeblich zur Verbesserung der Auflösung beiträgt. Wie schon oben erwähnt wurde (s. Kapitel 3.1.6), beeinflusst die Ausdehnung des Anregungsfokus maßgeblich die PSF-Breite der detektierten Fluorophore in der konfokalen Mikroskopie. Bei stimulierter Lichtemission handelt es sich um einfallende elektromagnetische Strahlung, die die Emission angeregter Moleküle bzw. Atome auslösen kann. Dabei muss die Energie des einfallenden Lichtes (Abregungslicht) gleich der Energiedifferenz der Zustände sein, die Moleküle infolge der Abregung wechseln. Der rot-verschobene STED-Laser zwingt angeregte Moleküle dazu, aus dem  $S_1$ -Schwingungsgrundzustand in höher liegende Vibrationszustände des  $S_0$ -Zustands zu relaxieren (s. Abbildung 3.20 a). Spontane und stimulierte Emission lassen sich durch einen geeigneten Emissionsfilter problemlos spektral auftrennen. Das effektive fokale Anregungsvolumen in lateraler Richtung lässt sich in der STED-Mikroskopie dadurch verkleinern ( $< \lambda/2$ ), wenn ein ringförmiger Abregungslaserstrahl konzentrisch mit dem Anregungslaserstrahl in der Fokusebene überlagert wird. Diese Laserkonstellation wird strukturelle bzw. ortsspezifische Beleuchtung genannt. So nimmt der STED-Laser in der Fokusebene die Form eines sogenannten Donuts an (s. Abbildung 3.20 b-c). Das Fluoreszenzlicht eines Moleküls wird nur dann detektiert, wenn sich dieses Fluorophor innerhalb des verkleinerten effektiven Anregungsfokus beim Scannen in lateraler Richtung

befindet. Seine PSF wird somit umso schmaler, je kleiner der effektive Anregungsfokus ist. An dieser Stelle ist es wichtig zu erwähnen, dass die Abregung des  $S_1$ -Zustands innerhalb der kurzen Fluoreszenzlebensdauer (ns) stattfinden muss, um mit der schnellen Rate der spontanen Emission konkurrieren zu können. Diese Abhängigkeit spiegelt sich in der Notwendigkeit von sehr hohen STED-Laserleistungen wider (ab  $\text{MWcm}^{-2}$ ). Die Effizienz, mit der die Farbstoffe durch den STED-Laser ausgeschaltet werden, steigt nicht-linear mit zunehmender STED-Laserleistung an und weist ein Sättigungsverhalten ( $I_s$ ) auf. Die Auflösung eines STED-Mikroskops ist durch Gleichung 3.12 definiert. Die erreichbare Auflösung ist somit theoretisch unbegrenzt. Die maximale STED-Auflösung wird jedoch durch das Photobleichen der Fluorophore eingeschränkt, was den hohen STED-Laserleistungen geschuldet ist.

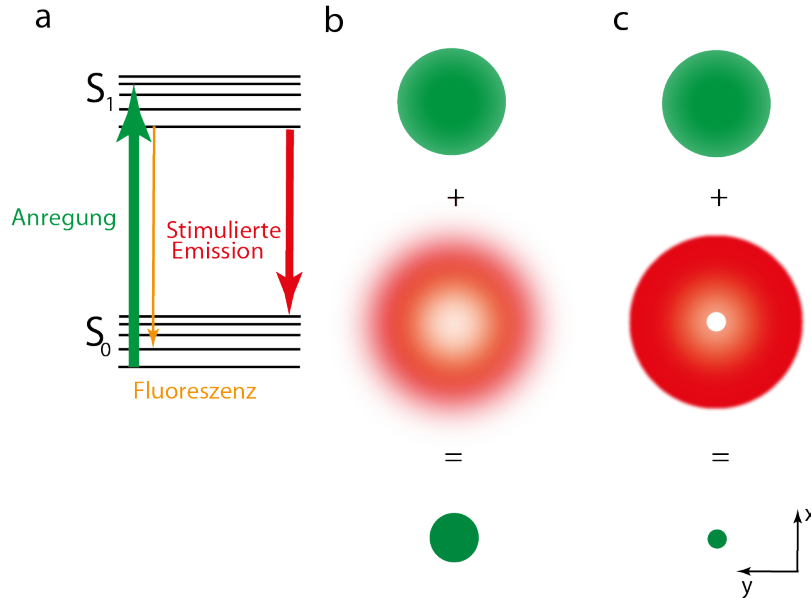


Abbildung 3.20: Das Prinzip der STED-Mikroskopie. (a) Das Jablonski-Diagramm ist mit dem Prozess der stimulierten Emission (rot), der mit der Fluoreszenz konkurriert, ergänzt. In (b-c) sind Profile in xy-Fokusebene von Anregungsstrahl (grün, oben), Abregungsstrahl bzw. STED-Strahl (rot, mittig) mit Form eines Donuts sowie das Profil (grün, unten) des resultierenden effektiven Anregungsvolumens durch die Überlagerung von oberen beiden Profilen schematisch dargestellt. Höhere STED-Intensitäten verkleinern das resultierende Anregungsvolumen (c) entlang der lateralen Richtung.

$$\Delta x = \frac{\lambda}{2NA\sqrt{1 + \frac{I}{I_s}}} \quad (3.12)$$

$\lambda$	=	<i>Wellenlänge des Anregungslichtes</i>
$I$	=	<i>STED-Intensität</i>
$I_s$	=	<i>STED-Sättigungsintensität</i>
$NA$	=	<i>numerische Apertur des Objektivs</i>

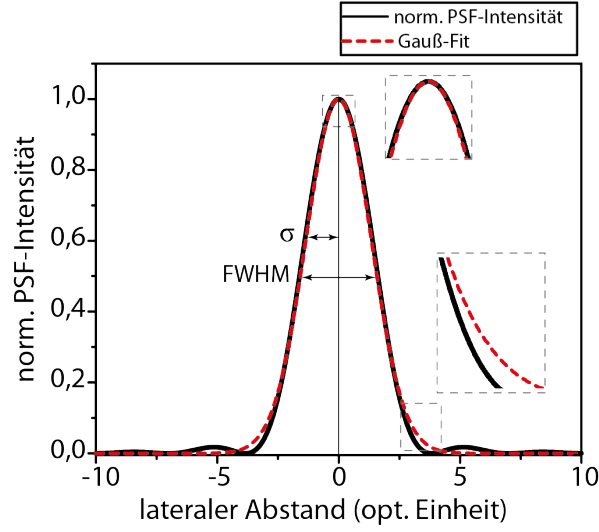
Es wurde eine alternative Methode entwickelt, um den Nachteil infolge hoher STED-Laserleistungen umzugehen. Es handelt sich um RESOLFT-Mikroskopie [57] (engl. reversible saturable optical linear fluorescence transitions), der das gleiche Prinzip der strukturellen Ausleuchtung (Donut) zu Grunde liegt wie bei STED. Dabei werden reversibel schaltbare Fluorophore benutzt, die Licht-induziert aus einem fluoreszenzaktiven in einen inaktiven Zustand wechseln können. Dieses Deaktivierungslicht nimmt die Donut-Form an. Da bei solchen schaltbaren Fluorophoren die spontane Umwandlung aus einem inaktiven in einen aktiven Zustand deutlich langsamer ist als die spontane Emission bei STED, ist die Sättigungsintensität des Deaktivierungslichtes bei RESOLFT um mehrere Größenordnungen kleiner als bei STED. Ergänzend lässt sich feststellen, dass sowohl STED als auch RESOLFT keine weiteren aufwendigen Bild-verarbeitenden Prozesse benötigen.

### 3.2.2 Lokalisierungsbasierte Superauflösungsmikroskopie

Lokalisierungsbasierte (LB) Superauflösungsmethode verbessert die Auflösung der Weitfeldfluoreszenzmikroskopie. Die konzeptionelle Grundlage dafür lieferte E. Betzig 1995 [7]. Zur Veranschaulichung der Funktionsweise dieser Methode wird zunächst ein Einzel-emitter betrachtet. LB-Superauflösungsmikroskopie beruht darauf, die relative Position des Fluorophors und somit die Koordinaten (x;y) des Intensitätsmaximums der lateralen PSF exakt zu bestimmen. Die ermittelte Position wird als Lokalisierung bezeichnet. Zu diesem Zweck kann eine zweidimensionale Gauß-Funktion als Näherung herangezogen werden (s. Gleichung 3.13). In Abbildung 3.21 ist es übersichtshalber eindimensional dargestellt. Das Gauß-Profil stimmt perfekt im oberen Bereich mit dem tatsächlichen PSF-Verlauf überein. Die Abweichungen im unteren Bereich sind für die Bestimmung des Zentrums der PSF irrelevant.

$$f(x, y) = A \cdot \exp \left( -\frac{1}{2} \left( \left( \frac{x - x_0}{\sigma_x} \right)^2 + \left( \frac{y - y_0}{\sigma_y} \right)^2 \right) \right) \quad (3.13)$$

$x_0, y_0$	=	<i>Koordinaten des Maximums einer 2D-Gauß-Funktion</i>
$\sigma_x, \sigma_y$	=	<i>Standardabweichungen einer 2D-Gauß-Funktion</i>



Abbildungung 3.21: Dargestellt ist ein idealer Querschnitt der lateralen PSF eines Emitters und dessen eindimensionaler Gauß-Fitfunktion zur Bestimmung des PSF-Zentrums mit entsprechenden Parametern:  $\sigma$  als Standardabweichung und FWHM als Halbwertsbreite.

Aus jedem beugungsbegrenzten Weitfeldbild während einer Aufnahme, in dem der betrachtete Farbstoff Licht emittiert, wird jeweils eine Lokalisierung des Fluorophors erhalten. Durch die Rekonstruktion aller erhaltenen Lokalisierungen während einer Messung wird sein supraaufgelöstes Bild als Punktwolke der Lokalisierungen erhalten (s. Abbildung 3.22 a). Der Prozess der Lokalisierung eines Farbstoffs und der Bestimmung des PSF-Zentrums kann mit einer statistischen Stichprobe verglichen werden, bei der jedes detektierte Photon zur Messung der lateralen Farbstoffposition beiträgt und der Stichprobenumfang der Photonenzahl gleicht [15]. Zur Vereinfachung wird zunächst eine laterale Dimension ( $x$ ) betrachtet. Die Standardabweichung der PSF entspricht somit der Standardabweichung ( $\sigma$ ) der Stichprobe und das Zentrum der PSF dem Mittelwert der Stichprobe. Wird die Stichprobe mehrfach wiederholt, d.h. ein Farbstoff wird mehrfach lokalisiert, so weisen die Mittelwerte der Stichproben eine Verteilung auf, deren Standardabweichung und somit Standardfehler jeder Stichprobe der Lokalisierungsgenauigkeit ( $\Delta x$ , entlang der  $x$ -Achse) der PSF entspricht (s. Gleichung 3.14). Daher hängt die Breite der erhaltenen Punktwolke in lateraler Richtung ( $x, y$ ) in erster Näherung von der Anzahl der emittierten Photonen pro Lokalisierung  $\sqrt{N}$  und der Standardabweichung ( $\sigma$ ) der PSF ab.  $\sqrt{N}$  entspricht ebenso der Standardabweichung des Schrotrauschens (s. Gleichung 3.7). Darüber hinaus haben weitere Faktoren wie die Pixelgröße ( $a$ ) und das Hintergrundrauschen ( $b$ ) einen Einfluss auf die Lokalisierungsgenauigkeit (s. Gleichung 3.15). Der negative Einfluss der Pixelgröße auf die Lokalisierungsgenauigkeit steigt mit

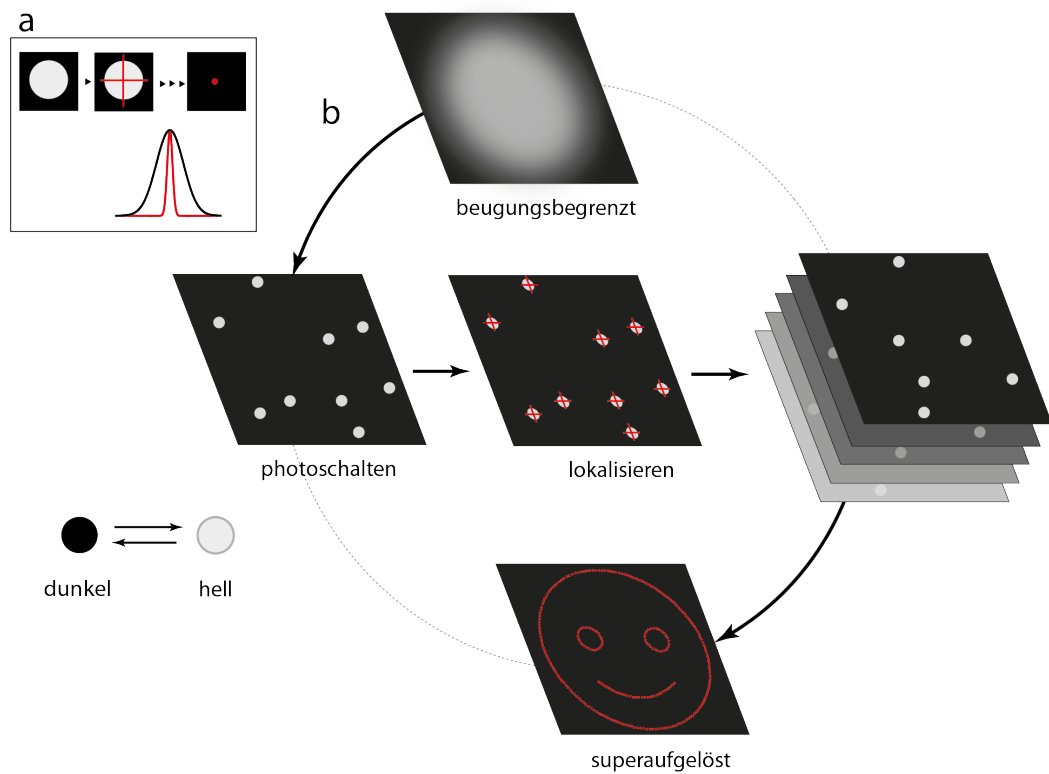


Abbildung 3.22: Schematische Veranschaulichung der LB-Superauflösungsmikroskopie. (a) Ohne Photoschalten: ein supraaufgelöstes Bild (rot) eines Einzelemitters (hell grau) wird durch wiederholtes Bestimmen seiner Position und durch Rekonstruktion der Lokalisierungen erhalten. (b) Eine fluoreszenzmarkierte Struktur wird erst dann mit LB aufgelöst, wenn die Fluorophore stochastisch photoschaltbar sind und nur wenige zum gleichen Zeitpunkt im beugungsbegrenzten Bereich fluoreszent sind.

ihrer zunehmenden Größe an. Wenn die Pixelgröße größer ist als die Beugungsgrenze (ca. 250 nm), kann die exakte Position des Fluorophors innerhalb des Pixels nicht mehr eindeutig bestimmt werden. Für die lokalisierungsbasierte Superauflösungsmethode entspricht die optimale Pixelgröße in etwa der Standardabweichung der PSF (ca. 100 nm) [15]. Bei hoher Photonenzahl wird die Lokalisierungsgenauigkeit durch das Schrotrauschen der Photonen dominiert, das eine inverse Quadratwurzel-Abhängigkeit von der Lichtintensität aufweist [15] (s. Gleichung 3.15). Bei kleiner Photonenzahl dominiert der Einfluss des Hintergrundrauschens auf die Lokalisierungsgenauigkeit (der zweite Term in Gleichung 3.15), so dass in dem Fall besonders viel Mühe für die Minimierung des Hintergrundrauschens (z.B. langsamere EMCCD-Auslesegeschwindigkeit, höherer EM-Gain-Faktor) aufgewendet werden muss. Darüber hinaus unterliegt die Qualität der lokalisierungsbasierten Superauflösungsmikroskopie dem Prinzip der Anhäufung der Lokalisierungen (s. Abbildung 3.24). Neben der Photonenzahl ist also auch die Dauer der Lebensspanne ei-

nes Fluorophors vor dem Eintreten des irreversiblen Photobleichens entscheidend, da nur über ein Mindestmaß an Lokalisierungen die räumliche Position eines Fluorophors zuverlässig zu bestimmen ist. Auch andere Einflüsse wie Probendrift und asymmetrische Fluoreszenzemission (z.B. kein frei rotierbares Fluorophor) beeinträchtigen die theoretische Lokalisierungsgenauigkeit [58].

$$\Delta x \approx \frac{\sigma_{PSF}}{\sqrt{N}} \quad (3.14)$$

$$\Delta x^2 = \frac{\sigma_{PSF}^2 + \frac{a^2}{12}}{N} + \frac{8\pi\sigma_{PSF}^4 \cdot b^2}{a^2 N^2} \quad (3.15)$$

$\Delta x$	=	<i>Lokalisierungsgenauigkeit in x- oder y-Richtung</i>
$\sigma_{PSF}$	=	<i>Standardabweichung der PSF</i>
$N$	=	<i>Anzahl der detektierten Photonen pro Lokalisierung</i>
$a$	=	<i>Pixelgröße</i>
$b$	=	<i>Hintergrundrauschen</i>

Wird eine Ansammlung von Fluorophoren betrachtet, d.h. eine fluoreszenzmarkierte biologische Struktur, ist darauf zu achten, dass zum selben Zeitpunkt nur wenige Farbstoffe fluoreszieren und der Abstand der emittierenden Fluorophore zu jedem Zeitpunkt nicht kleiner ist als die Beugungsgrenze (s. Abbildung 3.22 b). Diese zeitliche Modulation der Fluoreszenz wird als Photoschalten bezeichnet. Es wird zwischen irreversiblen und reversiblen Photoschalten unterschieden. Die erste Kategorie wird in der sogenannten PALM-Mikroskopie in vielen Fällen mit fluoreszierenden Proteinen verwendet (s. Kapitel 3.2.2.2). Reversibel schaltbare Fluorophore können mehrfach zwischen ihrem dunklen und fluoreszierenden Zustand lichtinduziert wechseln. Dies wird als stochastisches An- und Ausschalten (Blinken) der Fluorophore bezeichnet. Es gibt mehrere Möglichkeiten, um die Fluorophore zum Blinken zu bringen: zum einen durch Zugabe von Chemikalien (z.B. aliphatische Thiole/dSTORM, s. Kapitel 3.2.2.1), und zum anderen durch transientes Anbinden diffundierender Fluorophore an die zu untersuchende Struktur (DNA-PAINT [9], engl. point accumulation for imaging in nanoscale topography).

Ein idealer reversibel schaltbarer Fluorophor besitzt somit kontrollierbare lange Auszustände (tOFF), kurze Anzustände (tON  $\approx$  Integrationszeit der Kamera), gleichzeitig möglichst viele emittierte Photonen (mehrere tausend) pro Anzustand bzw. Lokalisierung und viele Schaltzyklen. Nimmt die Markierungsdichte innerhalb der Zielstruktur zu, so wird das Auflösungsvermögen nicht nur durch die Photonenzahl pro Lokalisierung bestimmt,

sondern auch durch die Kinetik des Blinkverhaltens (tON/tOFF) (s. Abbildung 3.23-3.24). Ist der Abstand zwischen den Fluorophoren, die gleichzeitig an sind, deutlich kleiner als die Standardabweichung der einzelnen PSF (ab ca. 50 nm), so kann die resultierende PSF kaum von der ursprünglichen PSF hinsichtlich der lateralen Standardabweichung und der Symmetrie unterschieden werden (Abbildung 3.23). Die gestiegene Spotintensität ist jedoch keine zuverlässige und aussagekräftige Größe, da die Photonenzahl pro Anzustand bzw. pro Lokalisierung selbst eine statistische Verteilung aufweist. Die so ermittelte Lokalisierung wird als sogenannte Doppellokalisierung bezeichnet. Ist der Anteil an Doppellokalisierungen signifikant, so werden fälschlicherweise die Positionen der Farbstoffe vermehrt ermittelt, an denen keiner der Farbstoffe anwesend sind (Abbildung 3.23 a-b). Die Doppellokalisierungen beeinträchtigen insbesondere dann die laterale Auflösung, wenn sie zwischen den aufzulösenden Teilstrukturen stattfinden (s. Abbildungen 3.23 a, Abbildung 3.24) [59]. Abgesehen von der Blinkkinetik der Fluoreszenzfarbstoffe hat auch de-

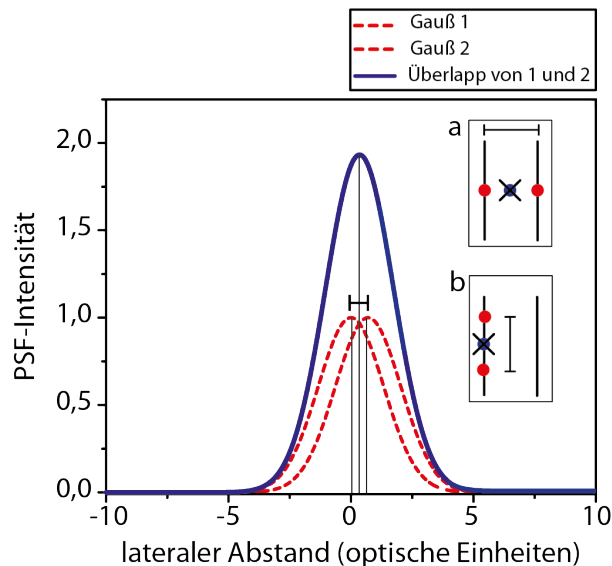


Abbildung 3.23: Der Effekt der Doppellokalisierungen in der lokalisierungsbasierten Superauflösungsmikroskopie am Beispiel einer aufzulösenden Linienstruktur (a-b). Überlagerung (blau) der PSFs zweier benachbarter Farbstoffe (rot), liefert eine falsche Position, an der sich keiner der Farbstoffe befindet. Die Konstellation in (a) beeinträchtigt am stärksten die laterale Auflösung.

ren Markierungsdichte einen Einfluss auf die erhaltene Auflösung. Das Nyquist-Kriterium besagt, dass der Abstand zwischen den Farbstoffen höchstens die Hälfte der kleinsten aufzulösenden Strukturgröße. Beträgt der Abstand zwischen den Linien 20 nm (s. Abbildung 3.24, aufzulösende Struktur) so müssen sich Farbstoffe im Abstand von höchstens 10 nm zueinander innerhalb einer Linie platziert sein [60]. Wie schon oben erwähnt wurde, ist die lokalisierungsbasierte Superauflösungsmikroskopie auf die Akkumulation von Lo-



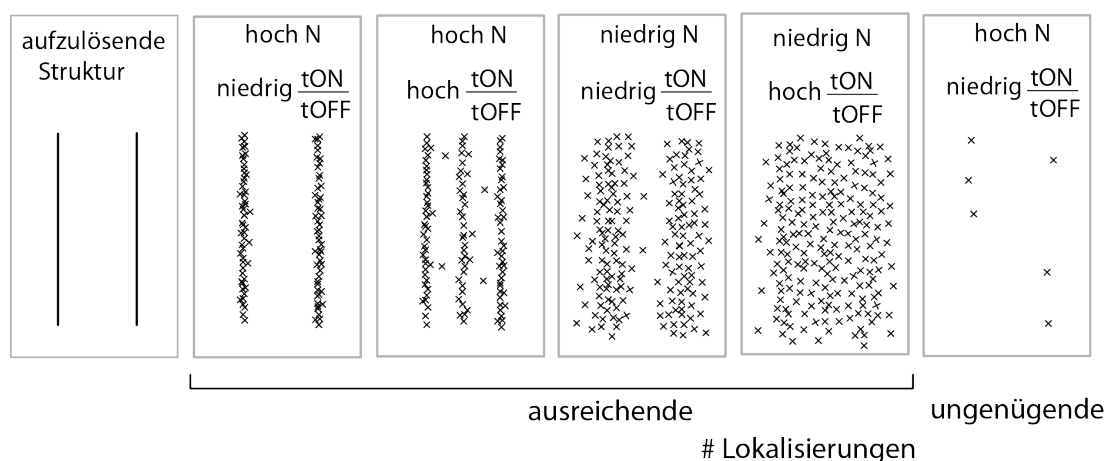
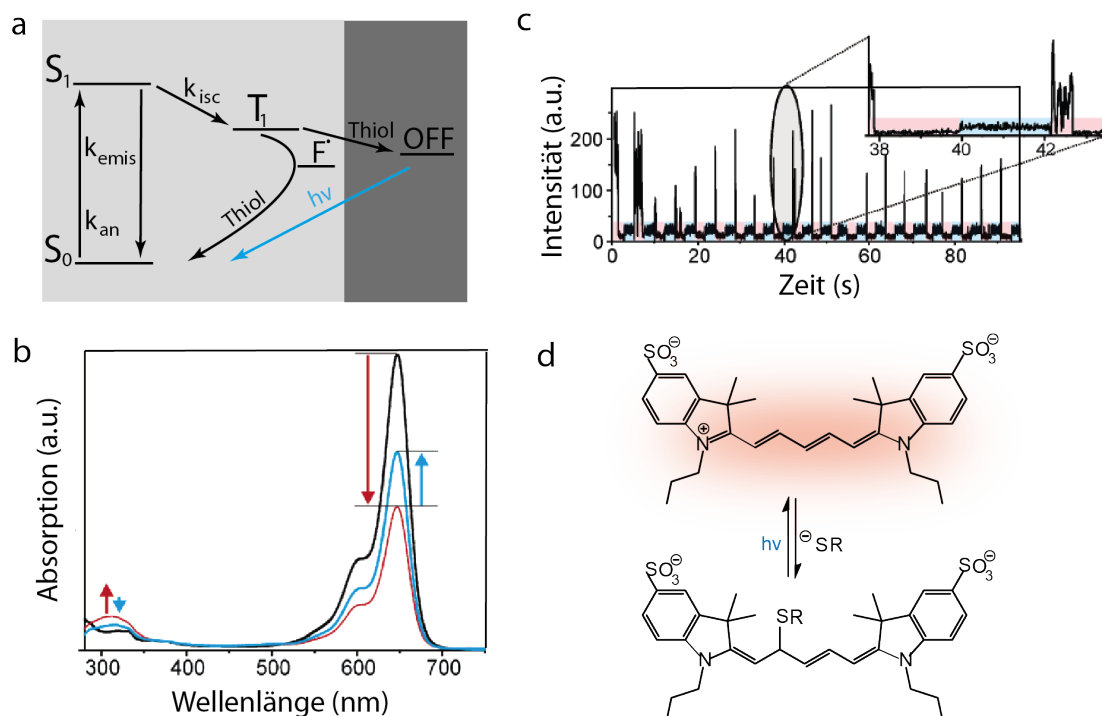


Abbildung 3.24: Schematisch dargestellt ist der Einfluss der Photonenanzahl ( $N$ ) pro Lokalisierung und der Blinkkinetik auf die Qualität des superaufgelösten Bildes der Zielstruktur, bestehend aus zwei fluoreszenzmarkierten Linien. Trotz optimaler Bedingungen (hoch  $N$ , niedrig  $t_{\text{ON}}/t_{\text{OFF}}$ ) kann eine geringe Anzahl der erhaltenen Lokalisierungen die Qualität der superaufgelösten Bilder massiv beeinträchtigen.

kalisierungen angewiesen. Durch die Rekonstruktion aller Lokalisierungen während eines Aufnahmefilms wird ein superaufgelöstes Bild erhalten. Das hat zur Folge, dass ein Aufnahme film eine Mindestlänge haben muss (meistens im Minutenbereich), innerhalb deren keine signifikanten strukturellen Veränderungen stattfinden sollen. Daher können nur die biochemischen Prozesse untersucht werden, die langsamer sind als die Aufnahme rate.

Die laterale Auflösung sowohl bei STED als auch lokalisierungsbasiert kann den einstelligen Nanometerbereich (5-6 nm) erreichen, wobei dieser Zahlenwert nur in speziellen Fällen (z.B. sehr hohe STED-, Anregungsleistung) erreicht werden [61, 62]. Es gibt mittlerweile eine neue superauflösende Mikroskopiemethode namens MINFLUX [63], engl. fluorescence microscopy with minimal photon fluxes, die erst 2017 von Hell et al. vorgestellt wurde. Diese vereint die Vorteile der STED- und der LB-Methode. Dabei wird die gleiche Lokalisierungsgenauigkeit mit einer Photonenanzahl erreicht, die um den Faktor 22 kleiner ist als bei der LB-Methode.

**3.2.2.1 Photoschalten mit aliphatischen Thiolen (dSTORM)** Die rot-absorbierenden Cyanin-Farbstoffe (Cy5, Alexa647) sind unter den kommerziell erhältlichen, konventionellen organischen Fluoreszenzfarbstoffen die ersten, die als molekulare reversible Photoschalter entdeckt und eingesetzt wurden [4]. Zum reversiblen Photoschalten sind Thiole ( $\beta$ -Mercaptoethanol (ME),  $\beta$ -Mercaptoethylamin (MEA)) und Sauerstoffentzug notwendig. Die Notwendigkeit des Sauerstoffentzugs ist in Kapitel 3.1.5 ausführlich be-



Abbildungung 3.25: Cyanin-Fluoreszenzfarbstoff Cy5 als molekularer Photoschalter mit aliphatischen Thiolen. (a) Das entsprechende Jablonski-Diagramm von photophysikalischen Prozessen. Der Farbstoff zirkuliert zwischen den Singulett-Zuständen  $S_1$  und  $S_0$  sowie dem Triplett-Zustand  $T_1$  infolge von ISC ( $k_{ISC}$ ). Der  $T_1$ -Zustand kann durch aliphatische Thiole infolge von mit der geminalen Rekombination verbundenem Elektronentransfer entvölkert werden. Alternativ können aliphatische Thiole einen langlebigen Dunkelzustand (hier als  $OFF$  bezeichnet) herbeiführen, der durch eine kurzweilige Reaktivierungslichtquelle in den Grundzustand  $S_0$  überführt wird. (b) Ensemble-Experiment zum Cy5-Photoschalten mit 100 mM MEA: das Absorptionsspektrum von Cy5 vor (schwarz) und nach (rot) der Bestrahlung mit rotem Laserlicht (650 nm) sowie nach der Reaktivierung mit 488 nm (blau) [4]. (c) Reversibles Photoschalten von Cy5 am Beispiel einer Fluoreszenzspur in Abhängigkeit von Anregungs- und Reaktivierungszyklen (rot: 633 nm, blau: 488 nm, 100 mM MEA) [4]. (d) Ein möglicher Mechanismus zur Bildung des Dunkelzustands infolge vorübergehender Addition des Thiolats an die Doppelbindung des konjugierten  $\pi$ -Systems von einem Cy5-Molekül. Das konjugierte  $\pi$ -System und somit die Fluoreszenzfähigkeit wird durch eine blau-verschobene Lichtquelle wiederhergestellt [5].

schrieben. Thiole depopulieren die Triplett-Zustände *via* geminaler Rekombination [52] (s. Kapitel 3.1.5.1) und andererseits sind sie an der Photokonversion des Fluoreszenzfarbstoffs in einen langlebigen reversiblen Dunkelzustand beteiligt (s. Jablonski-Diagramm in Abbildung 3.25 a). Der besagte Dunkelzustand weist eine erhöhte Absorption im kurzwelligen Spektralbereich (s. Abbildung 3.25 b, rot) auf. Der Grundzustand der Cyanin-Farbstoffe wird daher infolge der Bestrahlung mit einer blau-verschobenen Lichtquelle (320 - 500 nm)

zurückgewonnen (s. Abbildung 3.25 b, blau), wobei die Reaktivierung auf Einzelmolekül-niveau effektiver (ca. 90 %) stattfindet als in Küvettenexperimenten (s. Fluoreszenzspur in Abbildung 3.25 c) [4]. Hinzufügend ist die Reaktivierungseffizienz bei kürzeren Reaktivierungswellenlängen (320 - 400 nm) höher. In Fachkreisen wird angenommen, dass die Bildung des Dunkelzustands über den Triplett-Zustand verläuft [64]. Darüber hinaus gibt es experimentelle Hinweise darauf, dass der Mechanismus zur Bildung des Dunkelzustands auf einer vorübergehenden Addition des deprotonierten Thiois an die Doppelbindung der Polymethinkette beruht (s. Abbildung 3.25 d) [5]. Dies führt zu einer Verkürzung der Polymethinkette, was die Absorptionszunahme im kurzwelligen Spektralbereich erklären kann. Auf diese Weise lassen sich rot-absorbierende Cyanin-Farbstoffe ein paar dutzend Mal reversibel optisch schalten (s. Abbildung 3.25 c). Die Dauer der An- und Auszustände hängt von der Intensität der eingesetzten Anregungs- und Reaktivierungslichtquelle ab und lassen sich einstellen [65]. Im Schnitt werden mehrere tausend Photonen pro einzelnen Schaltvorgang detektiert [66]. Eine alternative effektive Reaktivierung des Dunkelzustands, die aber umständlich und daher weniger praktikabel ist, kann durch die direkte Nähe ( $< 1$  nm) von einem Cy3-Molekül (Aktivator) zum rot-absorbierenden Cyanin-Farbstoff (Reporter) realisiert werden (STORM). Dabei ist es für die Reaktivierung notwendig, dass sich das reaktivierende Cy3-Molekül im angeregten Zustand befindet [46]. Eine blinkende Fluoreszenzspur wie in Abbildung 3.25 c kann auch erzielt werden, wenn beide Lichtquellen gleichzeitig an sind. Die Auszustände können durch die Reaktivierungslaserleistung demensprechend angepasst werden.

Eine der am weitesten verbreiteten Methoden der lokalisierungs-basierten Superauflösungs-mikroskopie ist die sogenannte dSTORM-Methode (engl. direct stochastic optical reconstruction microscopy), die eben auf diesem Photoschalten von Fluorophoren durch den Sauerstoffentzug, Zugabe von aliphatischen Thiolen sowie durch eine blau-verschobene Reaktivierungslichtquelle ohne Aktivator-Cy3-Moleküle basiert. dSTORM findet eine breite Anwendung in vielen *in vitro*-Experimenten. Durch den notwendigen Sauerstoffentzug sind die Einsatzmöglichkeiten der dSTORM-Superauflösungsmethode im Mikroskopieren von z.B. lebenden Zellen eingeschränkt, obwohl im Inneren von vielen lebenden Zellen Thiole in mM-Konzentrationen vorhanden sind (z.B. Glutathion). In vielen Fällen ist dSTORM zum Abbilden von fixierten Zellen leichter umsetzbar.

Wie schon oben erwähnt wurde (s. Kapitel 3.2.2), hängt die Lokalisierungsgenauigkeit sowie das resultierende Auflösungsvermögen von der Anzahl der Photonen pro Lokalisierung bzw. Anzustand ab, die ein Farbstoff aussendet. Um die Photonenzahlen von rot-absorbierenden Cyanin-Farbstoffen in Kombination mit dSTORM zu erhöhen, wurde

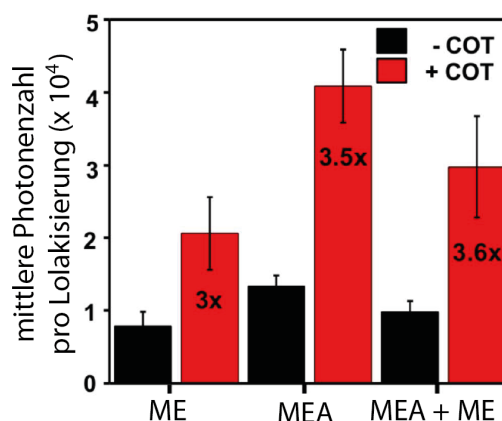


Abbildung 3.26: Photonenzahlen pro Lokalisierung aus lokalisierungsbasierten Superauflösungsmessungen in fixierten COS-7-Zellen unter Verwendung unterschiedlicher Thiol-Pufferzusammensetzung mit und ohne COT-Zusatz. Alle Messlösungen beinhalten Sauerstoffentzugssystem. ME-Puffer enthält 100 mM ME, MEA-Puffer: 100 mM MEA, MEA+ME-Puffer: 10 mM MEA und 50 mM ME. COT-Konzentration beträgt 2 mM [67].

ein weiterer Triplett-Quencher Cyclooctatetraen (COT) (s. Kapitel 3.1.5.1) zugesetzt [67] (s. Abbildung 3.26). In Kombination von COT mit dSTORM werden die Anzustände von Alexa647 verlängert, da COT mit den Thiolen (ME) um die Farbstoff- $T_1$ -Zustände konkurrieren. Um die Anzahl der Photonen pro Lokalisierung zu erhöhen, müssen in diesem Fall höhere Laseranregungsleistungen eingesetzt werden. Die Auszustände bleiben beim Einsatz von COT weitgehend unverändert. Auf diese Weise lässt sich eine Verdreifachung der Photonenzahl pro Lokalisierung erzielen [67]. Der Nachteil von COT ist, dass es in wässrigen Medien kaum löslich ist und organische Lösemittel (DMSO, DMF) als Vermittler braucht, die eventuell Einfluss auf die Fluoreszenzfarbstoffe nehmen können. Darüber hinaus wirkt COT toxisch, was den sowieso schon beschränkten dSTORM-Einsatz in lebenden Zellen noch weiter erschwert. Daher wird im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob mit ROXS (Trolox/Troloxchinon) als Triplett-Quencher mit geringerer Toxizität in Kombination mit dSTORM vergleichbare Ergebnisse wie mit COT erzielt werden können.

**3.2.2.2 Lokalisierungsbasierte Superauflösungsmikroskopie mit FPs** Allgemein gibt es drei Arten von fluoreszierenden Proteinen, die in der lokalisierungsbasierten Superauflösungsmikroskopie verwendet werden. Dabei handelt es sich um irreversibel photoaktivierbare, reversibel phototoschaltbare sowie FPs mit intrinsischem Blinkverhalten (s. Abbildung 3.27). Die erste Art von FPs wird in der sogenannte PALM (engl. photoactivated localization microscopy [10]) verwendet, die eine weitere Form der LB-Methode ist. Dabei werden inaktive Fluorophore jeweils irreversibel optisch aktiviert und infolge

von Fluoreszenzanregung werden deren Lokalisierungsdaten solange ausgelesen, bis das irreversible Photobleichen eingetreten ist. In meisten Fällen wird die UV-Lichtinduzierte Aktivierung durch irreversible chemische Veränderungen des Fluorophorzentrums sowie seiner unmittelbaren Umgebung begleitet (s. Abbildung 3.27 a). Zu den am weitesten verbreiteten irreversibel photoaktivierbaren FPs gehören PAmCherry1 und EosFP (s. Abbildung 3.28). Wie es in Abbildung 3.27 a gezeigt wird, erfolgt die Aktivierung von PAmCherry1 nach UV-Bestrahlung hauptsächlich in Form von Decarboxylierung im Glu215 und nachfolgender Oxidation der C-C-Bindung im Tyr66 durch den molekularen Sauerstoff [68].

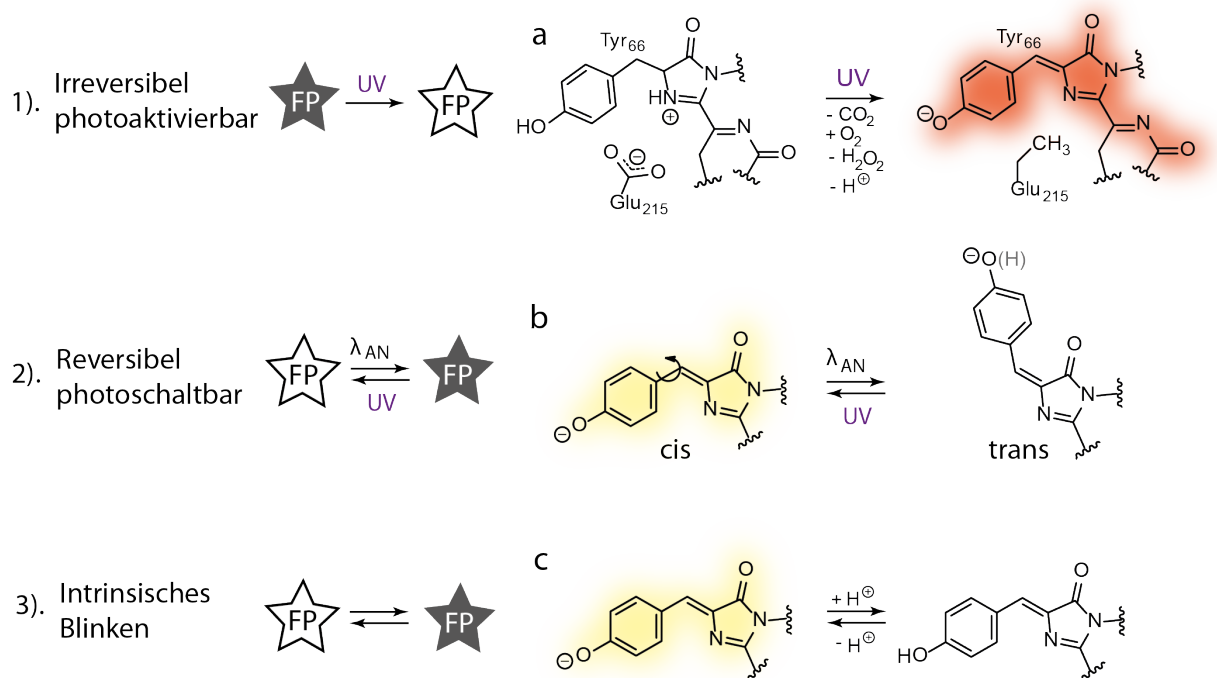


Abbildung 3.27: Drei unterschiedliche Typen von fluoreszierenden Proteinen mit entsprechenden Veränderungen am Fluorophorzentrum, die in der lokalisierungsbasierten Superauflösungsmikroskopie verwendet werden: (a) Durch UV-Strahlung irreversibel photoaktivierbare FPs am Beispiel von PAmCherry1, wobei es Hinweise gibt, dass sich das aktivierte Fluorophor in trans-Konformation befinden kann [68]. (b) Reversibel photoschaltbare FPs am Beispiel von EYFP mit cis-trans-Isomerisierung sowie (c) FPs mit intrinsischem Blinkverhalten infolge von Protolyse am Beispiel von EYFP.

Bei den reversibel photoschaltbaren FPs handelt es sich in meisten Fällen um anregungslichtinduzierte Umwandlung von fluoreszenzaktiver anionischer cis-Form in die inaktive trans-Konformation. Die Rückreaktion wird entweder durch UV-Bestrahlung induziert

oder erfolgt thermisch auf einer deutlich langsameren Zeitskala von mehreren Minuten bis Stunden. Es gibt Hinweise, dass die  $pK_s$ -Werte der trans-Konformation im höheren basischen Bereich liegen können, so dass unter physiologischen Bedingungen die trans-Form protoniert vorliegen kann [69]. Des Weiteren gibt es FPs mit intrinsischem Blinken, die neben dem Anregungslicht keine zusätzliche Lichtquelle benötigen. Das intrinsische Blinken im ms-Bereich kann z.B. durch ein Protolysegleichgewicht der cis-Konformation hervorgerufen werden. Befindet sich der  $pK_s$ -Wert der cis-Form nahe dem neutralen Bereich, so findet das intrinsische Blinken unter physiologischen Bedingungen statt [69]. EYFP gilt als Beispiel für die letzten zwei Typen von FPs (s. Abbildung 3.27 b-c) [36, 37].

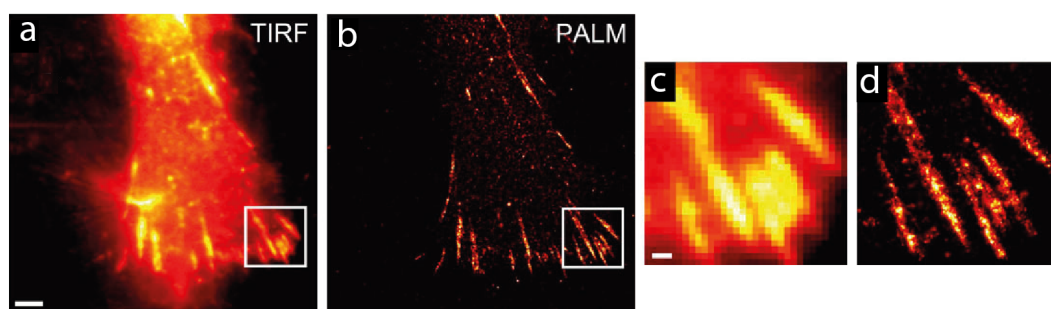


Abbildung 3.28: (a) Beugungsbegrenztes TIRF-Bild und (b) PALM-superaufgelöstes Bild von Praxilin-EosFP-Fusionsproteinen in einer *HeLa*-Zelle mit einem Maßstabsbalken von 2  $\mu\text{m}$  und (c-d) vergrößerte Ansichten von (a-b) mit einem Maßstabsbalken von 500 nm [70].

Wie schon in Kapitel 3.1.4.2 erwähnt wurde, weisen FPs als Fluoreszenzmarker zahlreiche Stärken, aber auch Schwächen auf. FPs können zum Aggregieren neigen, was wiederum unerwünschte Aggregatbildung von Fusionsproteinen herbeiführen und die native Verteilung von Zielproteinen innerhalb der Zelle beeinträchtigen kann [42]. Die Faltungseffizienz von FPs und vollständige Ausbildung vom Fluorophorzentrum zum Zeitpunkt der Bildaufnahme sind nicht immer zwingend 100 %. Daher kann der Anteil der detektierten Fusionsproteine und somit die Markierungsdichte deutlich geringer sein als das tatsächliche Proteinexpressionsniveau. Diese Defizite können zu einer fehlerhaften intrazellulären Struktur, zu vermindertem Auflösungsvermögen und eingeschränkter quantitativer Analyse des Zielproteins führen [42]. Einer der zentralen Einflussfaktoren auf die Auflösung in LB-Superauflösungsmikroskopie ist die emittierte Photonenzahl pro Lokalisierung. FPs sind meistens deutlich dunkler als organische Fluoreszenzfarbstoffe und emittieren somit meistens um den Faktor 10 weniger Photonen pro Lokalisierung [42]. Dieser Nachteil kann daher die Qualität von Superauflösungsmikroskopie gravierend beeinträchtigen. Um an diesen Schwachpunkten arbeiten zu können, bedarf es aufschlussreicher Analyse- und Optimierungsmethoden von FPs. Eine präzise und detaillierte Untersuchung der pho-

tophysikalischen Eigenschaften von einzelnen FPs exprimiert in Zellen im Hinblick auf lokalisierungsbasierte Superauflösungsmikroskopie (z.B. An-Auszeiten oder Anzahl der Schaltzyklen bzw. Lokalisierungen) gestaltet sich häufig sehr kompliziert. Das liegt im Wesentlichen daran, dass in Zellen mit exprimierten FPs eine relativ hohe Markierungsdichte vorliegt, um den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzsignale eindeutig jedem einzelnen FP zuzuordnen. Deswegen ist es in vielen Fällen ratsam, auf Untersuchungen *in vitro* zurückzugreifen [42], bei denen die Dichte der immobilisierten aufgereinigten Proteine gut kontrollierbar ist und diese somit eindeutig voneinander zu unterscheiden sind. Des Weiteren kann so der Einfluss des spezifischen intrazellulären Mediums verschiedener Zellen auf die FP-Eigenschaften besser untersucht werden und Vergleichbarkeit von Messergebnissen verschiedener FPs hergestellt werden.

### **3.2.3 DNA-Origami-Nanostrukturen als Referenzproben für die Superauflösungsmikroskopie**

Das Auflösungsvermögen ist insbesondere für die lokalisierungsbasierten Superauflösungsmethoden nur grob theoretisch abschätzbar. Das liegt überwiegend an der Fülle von Einflussfaktoren seitens des Mikroskops sowie der Probe (z.B. Laserleistung, Probendrift, Markierungsdichte usw.). Um die maximal erreichbare Auflösung von Mikroskopen testen und um unterschiedliche Mikroskopietechniken besser untereinander vergleichen zu können, sind Testproben mit kontrollierbaren, homogenen und reproduzierbaren Eigenschaften notwendig. Im Idealfall geht es um klar definierte Strukturen mit einem frei wählbaren Abstand zwischen den Fluoreszenzmarkierungen sowie mit einer kontrollierbaren Markierungsdichte. Für diese Zwecke wurde häufiger auf die in der Natur vorkommenden Strukturen im nanoskaligen Bereich zurückgegriffen. Dabei handelt es sich um intrazelluläre Strukturen, die leider nicht immer reproduzierbar und eindeutig sind. Am häufigsten werden zelluläre Polymere wie Aktinfilamente oder Mikrotubuli in fixierten Zellen oder *in vitro* [73, 74] benutzt (s. Abbildung 3.29). Diese Art von Proben erfüllt jedoch nur begrenzt die notwendigen Anforderungen an die Teststrukturen. Mikrotubuli sind beispielsweise röhrenförmige Filamente, die einen inneren und äußeren Durchmesser von jeweils ca. 14 nm und 25 nm haben (s. Abbildung 3.29 a) [71]. Würden sie zur Charakterisierung der Auflösung benutzt, so ist die maximal mögliche laterale Auflösung im Falle von einer direkten Markierung ohne Immunofärbung (mit Hilfe von primären, sekundären Antikörpern) auf 14 nm begrenzt. Werden die Filamente jedoch durch die konventionelle Immunofärbung markiert, so kann nur das äußere Profil der Filamente abgebildet werden.

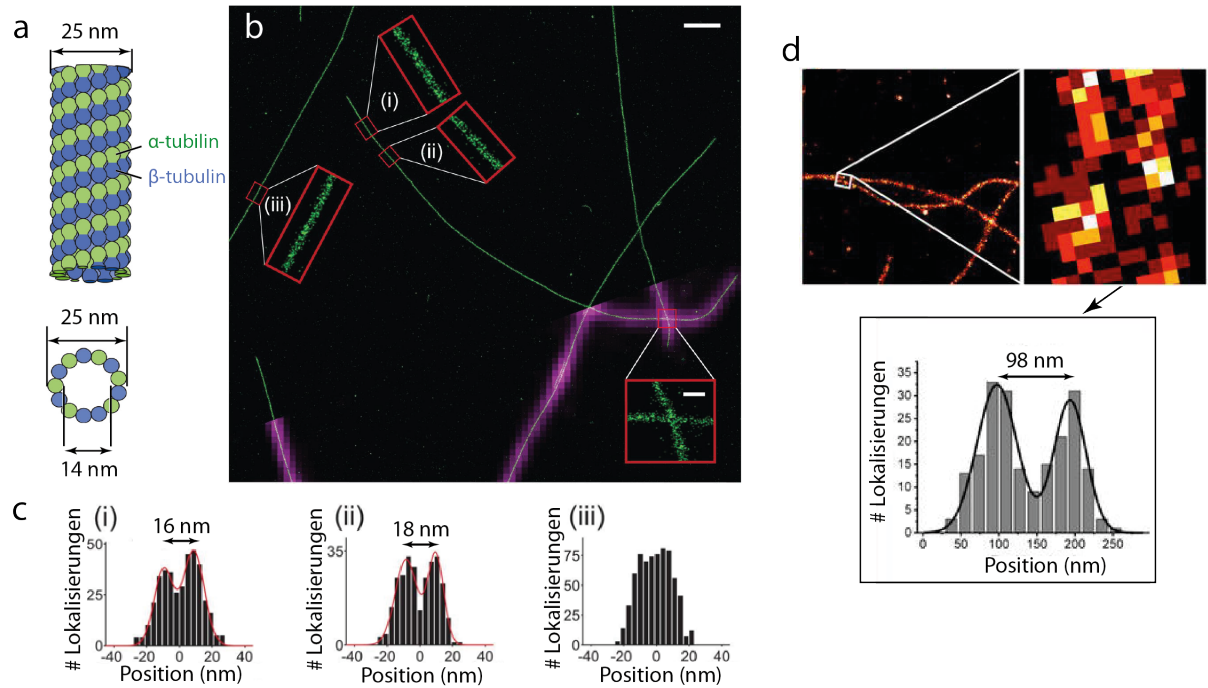


Abbildung 3.29: (a) Eine schematische Darstellung eines Mikrotubulus [71]. (b) Lokalisierungsbasiertes superaufgelöstes Bild der *in vitro* polymerisierten Mikrotubuli (grün) mit entsprechenden Querschnittshistogrammen i-iii (c). Die margenta-farbene Teilstruktur ist beugungsbegrenzt abgebildet. Die Filamente wurden mit Cy3B-Farbstoffen direkt ohne Immunofärbung markiert. Die Querschnittshistogramme der ausgewählten Regionen entlang der Fimalente (i, ii) deuten auf die röhrenförmige Filamentgeometrie mit einem inneren Durchmesser von ca. 17 nm hin, was gleichzeitig die maximal mögliche messbare Auflösung darstellt. (d) Lokalisierungsbasiertes superaufgelöstes Bild von immobilisierten Aktinfilamenten (links) mit einem vergrößerten Ausschnitt (rechts), in dem Filamente parallel zueinander verlaufen und das unten stehende Querschnittshistogramm ergeben [72].

Die Immunofärbung verbreitert darüber hinaus die räumliche Ausdehnung der Mikrotubuli, so dass die maximal erreichbare Auflösung mit dem effektiven Außendurchmesser von bis zu 60 nm übereinstimmt [74]. Des Weiteren weist das superaufgelöste Bild in Abbildung 3.29 iii Teilstrukturen auf, deren Querschnittshistogramme gar keine röhrenförmige Form besitzen. Das ist ein Hinweis für eine inhomogen verteilte Markierungsdichte, die laut dem Nyquist-Kriterium (s. Kapitel 3.2.2) einen Einfluss auf das Auflösungsvermögen hat. Auch zufällig parallel verlaufende Aktinfilamente werden häufig zur Demonstration der Auflösung benutzt (s. Abbildung 3.29 d) [75, 76]. Intrazelluläre Aktinfilamente haben einen Durchmesser von ca. 7 nm. Der gemessene Abstand zwischen den parallelen Filamenten verrät jedoch kaum etwas von der maximal möglichen Auflösung.

Eine rasante Entwicklung von einem sehr jungen Forschungsbereich namens strukturel-



le DNA-Nanotechnologie ermöglichte Alternativkonzepte zur Herstellung von artifiziellen Teststrukturen, die die oben genannten Anforderungen besser erfüllen. Dabei handelt es sich um die sogenannten DNA-Origami-Strukturen, die in der Fähigkeit der DNA zum „Falten“ ihren Ursprung haben. Desoxyribonukleinsäuremolekül (DNA) ist ein Biomolekül und besteht aus Nukleotiden bzw. Basen als Bausteine (Adenin/A, Thymin/T, Guanin/G, Cytosin/C). Jedes der Nukleotide besteht aus einer Phosphatgruppe, einem Desoxyribose-Zuckermolekül und einer heterozyklischen Nukleinbase. DNA ist in allen Lebewesen vertreten, denn als Erbgutträger enthält es den Bauplan des Lebens. Im natürlichen Zustand liegt DNA als schraubenförmige Doppelhelix (doppelsträngige, dsDNA) in B-Form vor, die durch die Wechselwirkungen in Form von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen gegenüberliegenden Basen gebildet wird. Dabei paaren sich Adenin mit Thymin und Cytosin mit Guanin sehr selektiv miteinander (Watson-Crick-Basenpaarung, s. Abbildung 3.30 a). Die Stabilität von dsDNA wird auch durch die Stapelwechselwirkungen zwischen den aufeinanderfolgenden Basen erhöht. In der dsDNA (B-Form) beträgt der Abstand zwischen den Basen 0,34 nm und der Durchmesser ca. 2 nm. Eine vollständige Drehung findet alle 3,4 nm statt. Daher befindet sich die Größenordnung kürzerer DNA-Doppelstränge (< ca. 500 Basenpaare) im nanoskaligen Bereich. In der Biologie gibt es noch stärkere spezifische Wechselwirkungen (z.B. Antigen/Antikörper) als in der DNA. Der Nachteil dabei besteht darin, dass sich diese Wechselwirkungen nur schlecht im großen Still parallelisieren und programmieren lassen wie im Falle von DNA-Polymerketten.

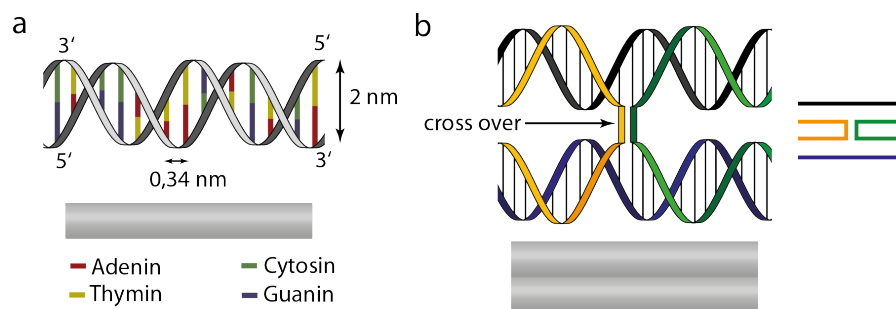


Abbildung 3.30: (a) Skizze einer doppelsträngigen DNA mit spezifischer Basenpaarung zwischen Adenin/Thymin und Cytosin/Guanin. (b) Skizze einer starren vierarmigen DNA-Struktur, die durch zwei Übergänge (engl. cross overs) aus vier DNA-Strängen gebildet wird, die der in der Natur vorkommenden labilen Holliday-Struktur sehr stark ähnelt.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass die mechanische Stabilität der Doppelhelices, die exquisite Selektivität der Basenpaarung (Hybridisierung) und daraus folgende Selbstorganisation DNA sowie Zugang zu den Dimensionen im nanoskaligen Bereich zu

einem potentiellen programmierbaren Baumaterial von Nanostrukturen machen. Die konzeptionelle Grundlage zum Einsatz von DNA als Baumaterial lieferte Nadrian Seeman in den frühen 1980er Jahren [77]. Somit war es die Geburtsstunde der modernen strukturellen DNA-Nanotechnologie. Dabei orientierte er sich an der in der Natur vorkommenden flexiblen vierarmigen DNA-Holliday-Struktur, bei der vier DNA-Stränge durch Überkreuzungen zusammengehalten werden (s. Abbildung 3.30 b). Durch den Symmetriebruch der künstlich hergestellten DNA-Sequenzen konnte eine starre vierarmige DNA-Struktur als Baublock zum Konstruieren von zwei- und dreidimensionalen periodischen Gittern aus kürzeren DNA-Strängen benutzt werden. Die Entwicklung der DNA-Origami-Technik von Paul Rothemund im Jahre 2006 war ein Durchbruch der strukturellen DNA-Nanotechnologie [11]. Der entscheidende Unterschied zu bisherigen Methoden bestand darin, dass neben den kürzeren DNA-Strängen ein viraler langer zirkulärer DNA-Strang (engl. scaffold, ca. 7.000 - 8.000 Basen) eingesetzt wurde (s. Abbildung 3.31 a). Auf diese Weise wurden hierarchische Elemente in die DNA-Selbstorganisation eingeführt, die eine signifikante strukturelle Stabilität und Ausbeute mit sich brachte. Jeder der DNA-Stränge (engl. staples, Heftklammern, 20 - 50 Basen) hat eine spezifische unverwechselbare DNA-Sequenz, die an bestimmte komplementäre Bereiche des Scaffolds *via* Hybridisierung binden. Auf diese Weise werden alle beteiligten DNA-Stränge in eine gewünschte programmierbare Form gebracht. Die vierarmigen DNA-Elemente spielen nach wie vor eine tragende Rolle, denn durch die aufeinanderfolgenden Übergänge von Scaffold und Staples werden die benachbarten Doppelhelices zusammengehalten (s. Abbildung 3.31 a). Ein zusätzlicher Vorteil der DNA-Origami-Technik besteht darin, dass der lange Scaffoldstrang aus Bakteriophagen relativ leicht gewonnen werden kann. Die kürzeren DNA-Stränge (staples) lassen sich hingegen relativ leicht künstlich herstellen. Zum Falten sind zum einen die an die Zielstruktur angepassten thermischen Bedingungen in Form von Erhitzen und sukzessivem Abkühlen der DNA-Stränge und zum anderen eine spezifische Salzkonzentration ( $\text{MgCl}_2$ ) zum Abschirmen der negativen Ladung der Phosphatreste notwendig. Normalerweise werden kürzere DNA-Staples in einem ca. 10-fachen molaren Überschuss im Vergleich zum Scaffold benutzt. Dadurch wird eine hohe Faltungsausbeute insbesondere bei zweidimensionalen DNA-Origami-Strukturen ( $> 90\%$ ) erreicht. Sowohl durch die Variation von Staple- als auch von Scaffold-Sequenzen konnten vielfältige zwei- und dreidimensionale aperiodische Nanostrukturen mit einer hohen strukturellen Homogenität, Reproduzierbarkeit und Stabilität unter physiologischen Bedingungen hergestellt werden (s. Abbildung 3.32). Ein hohes Maß an Parallelisierung ist eine weitere wichtige Eigenschaft der DNA-Origami-Technik, so dass in einem Faltungsansatz Milliarden von

identischen Nanostrukturen gefaltet werden. Softwaregestützte Gestaltung der gewünschten Strukturen sorgte zusätzlich für eine rasche Verbreitung der Technologie.

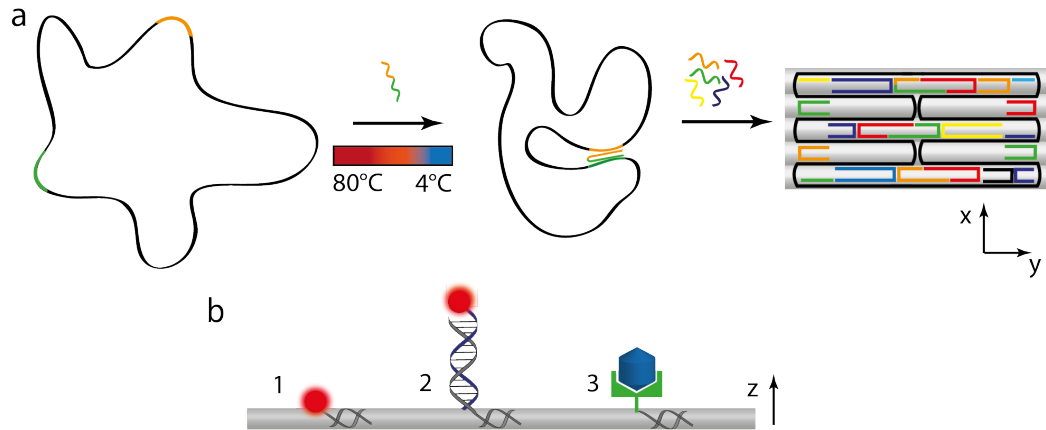


Abbildung 3.31: (a) Schematische Darstellung der Synthese von rechteckigen DNA-Origami-Strukturen aus einem zirkulären langen DNA-Strang (engl. scaffold) und vielen kurzen DNA-Strängen (engl. staples) mittels spezifischer Basenpaarung und Übergänge (engl. cross overs) unter einem bestimmten Temperaturprogramm. (b) Funktionalisierung von DNA-Origami-Strukturen: über chemisch funktionalisierte Staples/interne Markierung mit z.B. Fluoreszenzfarbstoffen (1), über verlängerte Staples, die als Anker zum Anbinden von chemisch funktionalisierten DNA-Gegensträngen/externe Markierung dienen (2) sowie über das Schlüssel-Schloss-Prinzip, wobei einer der Wechselwirkungspartner mit DNA gekoppelt ist (3).

Ein weiterer Vorteil der DNA besteht darin, dass diese kurzen artifiziellen DNA-Staples (20 - 50 Basen) relativ leicht mit vielen unterschiedlichen funktionellen Gruppen (Farbstoff- bzw. Biotin-Molekülen) gekoppelt werden können (Abbildung 3.31 b-1). Da die Position jedes Staples genau bekannt ist, können Markierungen wie z.B. Fluoreszenzfarbstoffe beim Falten mit einer Nanometerpräzision (ca. 1 nm) positioniert werden.

Daher basierte eine der ersten Anwendungen der DNA-Origami-Technik 2009 auf der Herstellung von nanoskopischen fluoreszierenden Nanometerlinealen [82] (s. Abbildung 3.33). Der Abstand zwischen den Basen in einer Doppelhelix (0,34 nm) gilt als ein Orientierungswert zur Abschätzung der Abstände zwischen den Fluoreszenzmarkierungen, die das zu testende Auflösungsvermögen darstellen. Ferner können kurze Staples mit einer zusätzlichen Ankersequenz verlängert werden, so dass nach dem Falten die Strukturen mit entsprechenden farbstoffmarkierten DNA-Gegensträngen extern markiert werden (s. Abbildung 3.31 b-2). Eine andere Art von externer Markierung basiert auf dem Schlüssel-Schloss-Prinzip (s. Abbildung 3.31 b-3), wobei eine relativ hohe Bindungsaffinität zwischen Rezeptor und Ligand dafür notwendig ist. Für die supraauflösende Fluoreszenz-

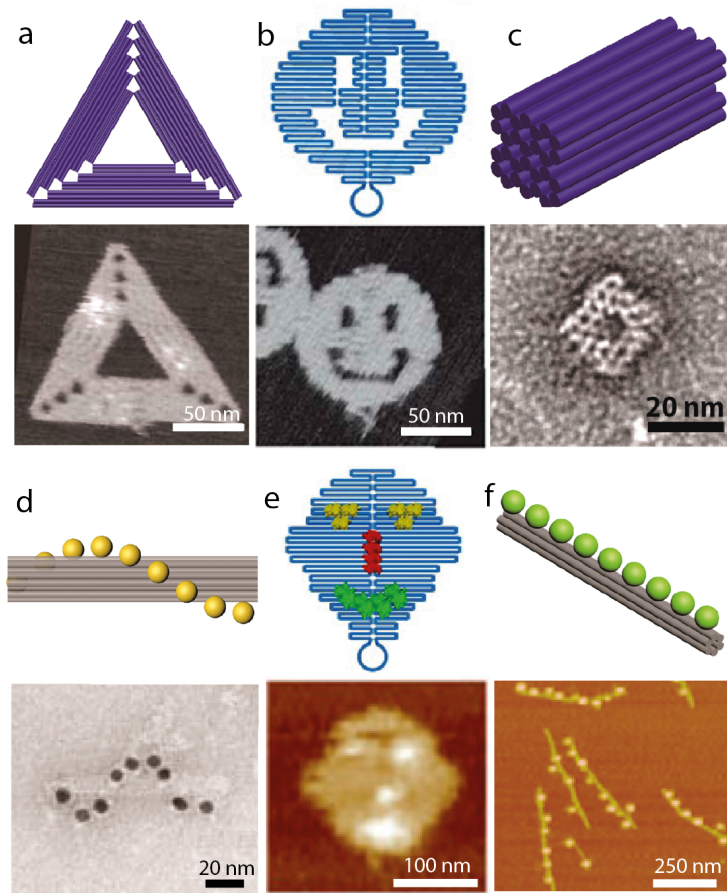


Abbildung 3.32: Schematische Darstellung von 2D- (a-b) und 3D- (c) DNA-Origami-Strukturen mit entsprechenden TEM- oder AFM-Bildaufnahmen: kompaktes einlagiges DNA-Origami in Form eines Dreiecks (a), eines Smileys (b) [11] und mehrlagige DNA-Origami-Struktur mit einer hexagonalen Packungsdichte aus parallelen DNA-Doppelhelices (c) [78]. (d-f) Schematische Darstellung von funktionalisierten DNA-Origami-Strukturen mit entsprechenden TEM- oder AFM-Bildaufnahmen: (d) 24-Helixbündel mit einer spiralförmigen Anordnung von Metallnanopartikeln [79], (e) Smiley-DNA-Origami, dessen Gesichtszüge infolge orthogonaler Immobilisierung von unterschiedlichen Proteinen sichtbar werden [80]. (f) 6-Helixbündel-DNA-Origami markiert mit Quantenpunkten *via* Biotin-Streptavidin Wechselwirkung [81].

mikroskopie ist es wichtig, die zu untersuchenden Objekte bzw. Strukturen auf einem Mikroskopdeckglas zu immobilisieren. Zu diesen Zwecken werden häufig das Deckglas mit dem Protein NeutrAvidin funktionalisiert, das sehr spezifisch mit Biotin wechselwirkt ( $K_d = 10^{-15}$  M), s. Abbildung 4.2. Die DNA-Origamis lassen sich daher kontrolliert immobilisieren, wenn einige Staples mit jeweils einem Biotin-Molekül modifiziert sind. Obwohl der strukturellen Vielfalt der DNA-Origami-Technik kaum Grenzen gesetzt sind, sind relativ einfache DNA-Strukturen (Rechteck, 6-12-Helixbündel) aufgrund ihrer Robustheit

und einfachen Handhabung besser für die fluoreszierenden Nanometerlineale geeignet. Die Abstände zwischen den Fluoreszenzmarkierungen im Bereich von ca. 5-300 nm, die für die Mikroskopie von großer Relevanz sind, werden dank der DNA-Origami-Technik zugänglich gemacht. Es dauerte nur wenige Jahre seit der Einführung der DNA-Origami-Technik, bis die unterste Grenze des Auflösungsvermögens moderner Fluoreszenzmikroskopie (ca. 6 nm) anhand der DNA-Nanometerlineale demonstriert wurde [61, 62, 63]. Die Anordnung der Fluoreszenzmarker lässt sich nach Belieben gestalten, und zwar z.B. in Form von Doppel- bzw. Tripelspots oder Strichen [83, 84]. Darüber hinaus sind DNA-Nanometerlineale als Referenzproben aufgrund ihrer strukturellen Vorhersehbarkeit und Einfachheit in der Handhabung sehr nützlich, um die Herkunft von Störfaktoren im Messvorgang besser zu identifizieren.

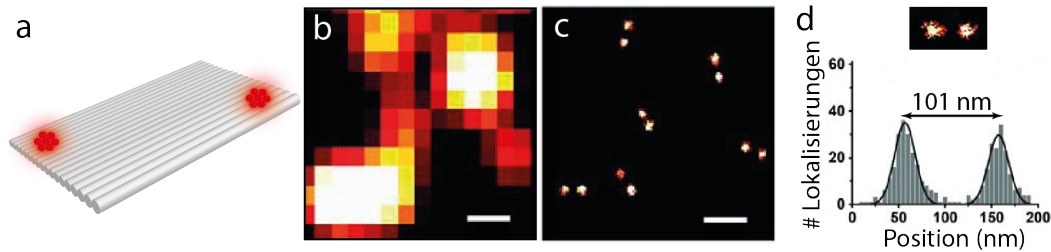


Abbildung 3.33: (a) Skizze eines rechteckigen DNA-Origami-Nanometerlineals mit einem Abstand von ca. 98 nm zwischen zwei Fluoreszenzmarkierungen, bestehend aus jeweils 7 Ankerstellen zum Anbinden von Alexa647-DNA-Gegensträngen (externe Markierung). (b) Beugungsbegrenztes TIRF-Bild und (c) superaufgelöstes Bild unter Benutzung der dSTORM-Methode. (d) Querschnittshistogramm eines superaufgelösten Doppelspots [84].

Die Anwendung der DNA-Origami-Technik in der Fluoreszenzmikroskopie begrenzt sich nicht nur aufs Vermessen von Abständen, sondern hat weitere vielfältige Einsatzmöglichkeiten z.B. im Bereich von Partikelverfolgung oder quantitativer Vermessung der PSF [85]. Dabei hängt die Qualität der Messergebnisse von den Eigenschaften der benutzten Punktlichtquellen ab. Da die Platzierung von Fluoreszenzfarbstoffen am DNA-Origami kontrolliert und mit einer Nanometerpräzision (ca. 1 nm) stattfindet, können kleine Punktlichtquellen (ca. 23 nm) mit einer sehr hohen homogenen Farbstoffdichte ohne störende Farbstoffwechselwirkungen wie Selbstlöschung erreicht werden. Diese Methode stellt eine bessere Alternative zu den konventionellen Polystyrol-Mikrokügelchen gefüllt mit Fluoreszenzfarbstoffen dar, die relativ groß ( $\geq 40$  nm) und stark heterogen in ihren spektroskopischen Eigenschaften sind [72]. DNA-Origami-Strukturen erwiesen sich auch als biokompatible Plattform zur ortsspezifischen Platzierung von Biomolekülen (z.B. Enzymen,

Enzymkaskaden, Holliday-Strukturen usw.) ohne Beeinträchtigung ihrer spezifischen Eigenschaften [86, 87]. Einzelmolekülmessungen von immobilisierten und mit Biomolekülen ausgestatteten DNA-Origami-Strukturen gewähren einzigartige Einblicke in die Dynamik und Wechselwirkungen, die in Ensemblemessungen nicht immer zugänglich sind. Strukturelle DNA-Nanotechnologie eröffnet praktisch unbegrenzte Möglichkeiten, DNA-Origami-Nanostrukturen als Nanoplattform mit beinahe allen vorstellbaren DNA-modifizierten Molekülen bzw. Metallnanopartikeln auszustatten. Angesichts dessen etabliert sich die DNA-Technologie immer stärker in Richtung realer, praxisorientierter Anwendungsbereiche wie Nanomedizin, insbesondere Medikamentenverabreichungssystem, Diagnostik [88, 89], Therapie [90], Nanorobotik [91, 92, 93], Nanoelektronik [94] und Nanoplasmonik [95, 96].

## 4 Material und Methoden

### 4.1 EYFP-spezifische Probenvorbereitung

#### 4.1.1 Rekombinante Produktion und Aufreinigung von EYFP

Das Plasmidkonstrukt<sup>1</sup> pTDeYFP-His<sub>6</sub>-Cys wurde mittels Hitzeschock-Transformation in den *E. coli*-Expressionsstamm BL21 eingebracht. Dafür wurden die Zellen mit dem Plasmid zunächst für 20 min bei 0 °C, für weitere 45 s bei 42 °C und anschließend für 2 min bei 0 °C inkubiert. Nach dem Hitzeschock wurden 400 µL SOC-Medium (Thermo Fischer Scientific) zugegeben und für 1 h bei 37 °C, 250 rpm kultiviert. Diese Lösung wurde dann 1:100 mit LB-Medium (mit 50 µg/ml Kanamycin) verdünnt und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Da das benutzte Plasmid eine Kanamycinresistenz trägt, konnten die gewünschten Zellen selektiv gezüchtet werden.

4 mL dieser Vorkultur wurden mit LB-Medium (mit 50 µg/mL Kanamycin) 1:100 verdünnt und weiter bei 37 °C, 180 rpm bis zu einem OD<sub>600</sub>-Wert von ca. 0,5 kultiviert. Durch Zugabe des Induktors IPTG (125 µM) wurde die Proteinexpression eingeleitet und für weitere 2 h bei 37 °C, 180 rpm kultiviert. Nach der Proteinexpression wurde die Zellkultur abzentrifugiert (15 min, 4 °C, 10.000 rpm) und das erhaltene Pellet wurde mit ca. 25 mL Lysispuffer (B-PER) versetzt und ca. 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde 1 µL DNase zugegeben und für weitere 30 min inkubiert. Nach dem Zellaufschluss wurden unlösliche Zellbestandteile durch Zentrifugieren abgetrennt (25 min, 4 °C, 30.000 rpm), wobei der Überstand (Zelllysate) das wasserlösliche EYFP-(Cys-His<sub>6</sub>)-Protein enthielt. Im nachfolgenden Schritt wurde das Zelllysate auf eine Ni-NTA Affinitätssäule (5 mL Säulenvolumen, SV) gegeben. Die Ni-NTA Säule wurde im Vorfeld mit 10x Säulenvolumen gewaschen. Immobilisierte EYFP-Proteine wurden mit 10x SV des Waschpuffers aufgereinigt und mit 10 mL Imidazol-haltigem Elutionspuffer eluiert. Danach wurde die aufgereinigte Protein-Lösung durch eine druckbetriebene Ultrafiltration (10k MWCO-Filter, OMEGA, 25 MM) auf ca. 600 µL aufkonzentriert. Im letzten Aufreinigungsschritt wurde eine NAP5-Säule mit 10 mL PBS-1 (16,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 83,3 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7,3) equilibriert, um danach das Protein umzupuffern (PBS-1).

Proteinsequenz von eYFP-His<sub>6</sub>-Cys:

MAISDPNSIVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKL  
TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGLQCFARYPDHMKQHDFFKSAWPEG

---

<sup>1</sup>Das Plasmid wurde von Dr. T. Dammyer konstruiert, basierend auf dem pEYFP-C1 Vektor, Clontech, Takara.

YVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLE  
 YNYSNHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGP  
 VLLPDNHYLSYQSKLSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYKHHHH  
 HHC

#### 4.1.2 Synthese und Analyse von EYFP-DNA-Konjugaten

Die Säulen Superdex 200, 10/300 GL und MonoQ 4.7/100 PE wurden mit einer FPLC-Anlage, Äkta Purifier, GE Healthcare Life Science betrieben. Das eingestellte Fraktionierungsvolumen betrug 0,5 mL und die Flussraten 0,5 mL/min. Die Synthese des EYFP-DNA-Konjugats erfolgte unter Benutzung eines sSMCC-Linkers, aminomodifizierten DNA-Oligonukleotids (NH<sub>2</sub>-DNA, NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>-5'-GTG ATG TAG GTG GTA GAG GAA-3') und EYFP mit einer Cysteingruppe am C-Ende (s.o.) [97, 98, 99]. Eine wässrige Lösung von NH<sub>2</sub>-DNA (25  $\mu$ M, 500  $\mu$ L, in PBS-1) wurde mit dem 1,5 g sSMCC-Linker (100x molarer Überschuss zu DNA), der vorher in 50  $\mu$ L DMF gelöst wurde, für 1,5 h, 35 °C, 300 rpm inkubiert. Danach wurde die Mischung chromatographisch mit einer Gelfiltrationssäule (Superdex) mit PBS-1 als mobile Phase und unter Beobachtung der Absorbanz bei 260 nm, 280 nm, 514 nm aufgetrennt, um die Maleimid-aktivierte DNA getrennt vom überschüssigen sSMCC-Linker zu erhalten. Um EYFP (170  $\mu$ M, 500  $\mu$ L) zu aktivieren und somit mögliche S-S-Bindungen zwischen EYFPs zu spalten, wurde das Protein mit Dithiothreitol (DTT, 1 M, 120  $\mu$ L) lichtgeschützt inkubiert (30 min, 35 °C, 300 rpm) und anschließend chromatographisch (Superdex) mit PBS-2 (16,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 83,3 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 6,8) als mobile Phase aufgereinigt. Im letzten Schritt wurde aktivierte DNA und EYFP (im ca. 4-fachen molaren Überschuss zu NH<sub>2</sub>-DNA) vereint und ca. 12 h, 170 rpm, 23 °C lichtgeschützt inkubiert. Nach der Reaktion wurde das Volumen dieser Mischung über eine druckbetriebene Ultrafiltration (s.o.) auf ca. 450  $\mu$ L reduziert. Der letzte Aufreinigungsschritt erfolgte unter Benutzung der Anionenaustauschchromatographie (MonoQ) mit einem NaCl-Gradienten (0 M - 1 M) und Tris-Puffer (20 mM Tris, pH 7,3) als mobile Phase. Die erwähnten Konzentrationen wurden aus den Absorbanzwerten und Extinktionskoeffizienten berechnet:

DNA-ON<sub>21</sub> bei 260 nm  $\epsilon = 20 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , EYFP bei 514 nm  $\epsilon = 8,4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [100].

Der Hauptpeak (II) aus dem Anionenaustauschchromatogramm (s. Abbildung 5.11) wurde mit nativer und denaturierender PAGE-Gelelektrophorese (Polyacrylamidgel, 15 %, 200 mV, 1 h) untersucht (s. Tabelle 9.1). Die Konzentration aller zu untersuchenden Pro-



ben wurden zu ca.  $0,5\ \mu\text{M}$  verdünnt. Mittels nativ-PAGE wurde die elektrophoretische Mobilität von Peak II mit unkonjugierten und aktivierten EYFP verglichen. Des Weiteren wurde Peak II mit dem Atto655-DNA-Gegenstrang (1:1, jeweils ca.  $2\ \mu\text{M}$ -Endkonzentration) für 15 min,  $30\ ^\circ\text{C}$  hybridisiert. EYFP, Peak II, Peak II/Atto655-DNA wurden mit Tris-Puffer (20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7,3) und 2x Ladepuffer entsprechend verdünnt. Die Probenbanden wurden anschließend mit einem Fluoreszenzscanner Typhon FLA-7000 durch 2-Farbenanregung (473/670 nm) visualisiert, wobei das Fluoreszenzsignal der beiden Farbkanäle übereinandergelegt wurde. Zur Analyse der molekularen Masse von Peak II wurde denaturierende SDS-PAGE-Gelelektrophorese herangezogen. Aufgereinigtes EYFP-Protein und Peak II wurden mit dem denaturierenden Ladepuffer 1:1 verdünnt und für 10 min,  $95\ ^\circ\text{C}$ , 400 rpm inkubiert. Als Referenz für die Masse wurde eine Proteinleiter (PageRuler Unstained Broad Range, ThermoScientific) eingesetzt. Zum Visualisieren der Banden wurde das SDS-PAGE-Gel in einer Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend in einer Entfärbelösung entfärbt. Als Referenzprobe wurde Proteinleiter (PageRuler Unstained Broad Range, ThermoScientific) benutzt.

#### 4.1.3 Fluoreszenzmarkierung des Nanoantikörpers

Anti-EYFP-Nanoantikörper (Nb, Chromotek) wurde kommerziell erworben und mit Alexa-647-NHS (Molecular Probes/Life Technologies, A37573) nach Gebrauchsanleitung des Herstellers Life Technologies (MAN0001774) gekoppelt<sup>2</sup>. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte über frei zugängliche Aminogruppen des Nanoantikörpers in einer Ein-Schritt-Reaktion mit NHS-Alexa647 und mit anschließender chromatographischer Aufreinigung über eine Gelfiltrationssäule (Superdex 200, 10/300 GL, als PBS als Laufpuffer mit 10 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,7 mM KCl, 140 mM NaCl). Für die Berechnung der Kopplungsstöchiometrie wurde der Absorbanzwert von Nb-Alexa647 bei 280 nm gegen die Eigenabsorption von Alexa647 korrigiert, woraus die Nb-Konzentration berechnet wurde (s. Life Technologies, MAN0001774). Die Konzentrationsbestimmung des Farbstoffs wurde aus den Absorbanzmessungen bei 650 nm vorgenommen.

---

<sup>2</sup>Die Markierung wurde im Rahmen einer Bachelorarbeit von Christina Priebe durchgeführt.

## 4.2 Probenvorbereitung für Einzelmolekülmessungen

### 4.2.1 DNA-basierte Proben

Die Sequenzen der benutzten DNA-Staples für DNA-Origami-Strukturen sind im Anhang aufgelistet. Alle modifizierten und unmodifizierten DNA-Stränge wurden kommerziell erworben (Eurofins MWG).

(a). 12HB-DNA-Origami-Strukturen wurden aus einer Mischung hergestellt, die aus einem p8064-Scaffold (10 nM), unmodifizierten DNA-Staples mit einem 10-fachen molaren Überschuss und aus modifizierten Staples (Biotin, Atto647N und Ankerverlängerungen) mit einem 30-fachen molaren Überschuss im Faltungspuffer (5 mM Tris, 1 mM EDTA, 16 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8) mit einem Gesamtvolumen von 100 µL bestand. Der Faltungsprozess fand in einem Thermocycler (MJ Research, PTC-225) nach folgendem Temperaturprogramm statt: (1) 80 °C, 15 min; (2) 80 °C - 66 °C, 5 min pro °C; (3) 65 - 30 °C, 30 min pro °C. Überschüssige DNA-Staples wurden durch dreifaches Filtern mit dem Faltungspuffer (jeweils 10 min, 10.000 rcf, AmiconUltra, 0,5 mL, 100k Zentrifugenfilter) entfernt. Anschließend wurden die gefalteten DNA-Origami-Strukturen in ein Mikrozentrifugationsgefäß (15 min, 3.000 rcf) überführt (25 µL, ca. 30 nM). Zum externen Markieren wurden die aufgereinigten DNA-Nanostrukturen mit EYFP-DNA-Konjugaten mit ca. 5-fachen molaren Überschuss pro Ankerstrang für 2 h, 37 °C inkubiert. Zunächst wurden die Amiconfilter mit einer BSA-Lösung (0,1 mg/mL) abgesättigt, indem sie dreimal mit der besagten Lösung zentrifugiert wurden (10 min, 8.000 rcf). Das war notwendig, um die unspezifische Wechselwirkung des Filtermaterials mit den EYFP-DNA-Origami-Strukturen und die daraus resultierenden Verluste zu vermeiden. Anschließend wurden die fluoreszenzmarkierten 12HB-DNA-Strukturen mit dem Faltungspuffer (zusätzlich mit 0,1 mg/mL BSA) gefiltert (10 min, 8.000 rcf) und zurückgewonnen wie unmarkierte 12HB-Origami-Strukturen (s.o.). Des Weiteren war für die 2-Farben-Superauflösungsmessungen (EYFP und Alexa647) ein zusätzlicher Markierungsschritt mit Alexa647-5'-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3' notwendig, wobei die dafür notwendigen Ankerstränge die unmodifizierten Staples ersetzen. Die Aufreinigungsschritte waren analog zu EYFP-Markierung.

(b). Rechteckige DNA-Origami-Strukturen wurden analog zu den 12HB-Nanostrukturen gefaltet, wobei das Protokoll folgendermaßen verändert wurde: p7249-Scaffold (17,6 nM), Faltungspuffer (5 mM Tris, 1 mM EDTA, 12,5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8) und Temperaturprogramm: (1) 90 °C, 15 min; (2) 89 °C - 20 °C, 1 min pro °C.

Filterbasierte Aufreinigung nach dem Falten und Markieren mit Alexa647-5'-TTTGTGATGTAGGTGGTAGAGGAA-3' erfolgte analog zu den 12HB-Strukturen. Die Alexa647-

markierten rechteckigen DNA-Strukturen wurden anschließend mittels Agarosegel-Elektrophorese (1,5 %) aufgereinigt (s. Abbildung 4.1). Die Visualisierung der Probenbanden erfolgte durch Anfärbung mit SYBRGold als Nukleinsäuregel-Fluoreszenzfarbstoff (Thermo Fischer Scientific) sowie Fluoreszenzanregung durch UV-Licht (VWR GenoSmartUV). SYBRGold (1  $\mu$ L, 10.000x Stocklösung in DMSO) wurde vorm Erhärten des Gels hinzugegeben. Die Aufreinigung der EYFP-12HB-Strukturen mit SYBRGold/Agarosegel-Elektrophorese ist dadurch erschwert, dass SYBRGold einen starken Fluoreszenzhintergrund im blauen Anregungsbereich verursacht.

Für die DNA-PAINT-Messungen wurden die gefalteten rechteckigen DNA-Origami-Strukturen gleich mittels Agarosegel-Elektrophorese (s.o.) aufgereinigt. Die Länge der benutzten DNA-PAINT-Stränge betrug je nach Mikroskop 6 oder 8 Basen mit folgenden Sequenzen: 5'-CGGGCA-3'-Atto655 (6 Basen), 5'-CGGGCATT-3'-Atto655 (8 Basen)

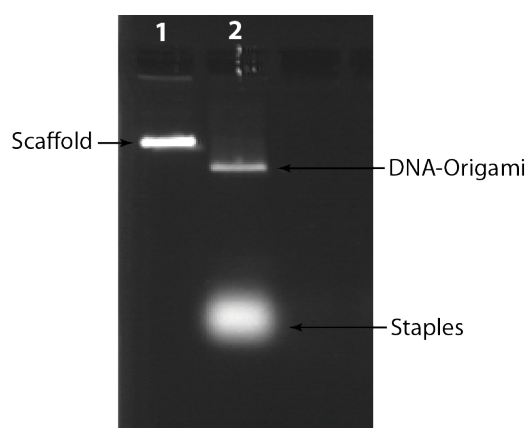


Abbildung 4.1: Agarosegel-Elektrophorese (15 %) von rechteckigen DNA-Origami-Strukturen und Scaffold als Referenz: 30  $\mu$ L DNA-Probe (30-5 nM) wurden mit 10x BlueJuice<sup>TM</sup>-Ladepuffer versetzt, in die Taschen geladen und anschließend mit 0,5x TBE-Puffer, 11 mM MgCl<sub>2</sub> als Laufpuffer unter 80 V, 90 min aufgereinigt. Scaffold, DNA-Origamis und freie Staples weisen unterschiedliche elektrophoretische Mobilität auf.

(c). Fluoreszenzmarkierter DNA-Strang (Cy5, Alexa647) wurde mit einem Biotin-DNA-Gegenstrang unter Erhitzen auf 45 °C und langsamem Abkühlen (1 min pro °C) auf 20 °C hybridisiert.

Cyanin-5'-TTTGTGATGTAGGTGGTAGAGGAA-3'

Biotin-5'-TTCCTCTACCACCTACATCACAA-3'

### 4.2.2 Passivierung von Glasoberflächen für Objektiv-TIRF

Für die Objektiv-TIRF-Messungen (mit Ausnahme von EYFP/Alexa647-Nanoantikörper, s. Kapitel 4.2.3) wurden Kammerdeckgläser (Lab-Tek, Thermo Scientific 155409, # 1,5) benutzt. Zunächst wurden sie mit 1 M KOH für ca. 15 min gereinigt und mit PBS-Puffer (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) dreimal gespült. Chemische Passivierung (s. Abbildung 4.2) erfolgte im ersten Schritt mit einer BSA-Biotin-Lösung (0,5 mg/mL in PBS, 100  $\mu\text{L}$  je Kammer, 4 °C, über Nacht). Anschließend wurden die Kammern gründlich mit PBS gespült und mit einer NeutrAvidin-Lösung (0,5 mg/mL in PBS) für 1 h, bei RT inkubiert. Mit drei nachfolgenden Waschschritten mit PBS war die chemische Passivierung der Kammern abgeschlossen. Die zu untersuchenden Proben (z.B. dsDNA-Alexa674/Cy5, fluoreszenzmarkierte DNA-Origami-Strukturen) wurden auf ca. 200 pM verdünnt, bevor sie zum Immobilisieren in die Kammern gegeben wurden. Nach der Inkubationszeit von ca. 10 min bei RT wurde ungebundene Probe durch drei Waschschriffe mit PBS entfernt.

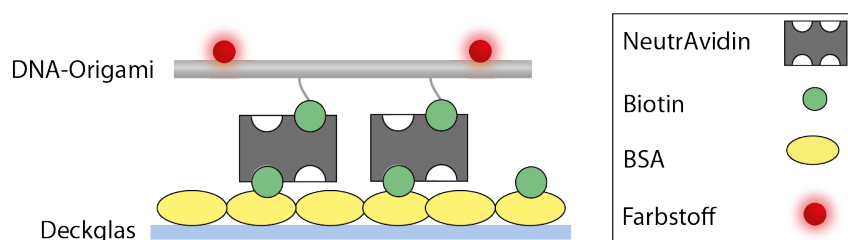


Abbildung 4.2: Passivierung von Lab-Tek-Kammern mit BSA-Biotin und NeutrAvidin, das vier Bindetaschen für Biotin-Moleküle hat. DNA-Origami-Strukturen sind mit Biotin-Molekülen ausgestattet und binden an die passivierte Oberfläche über Biotin-NeutrAvidin-Wechselwirkung.

### 4.2.3 Passivierung von Glasoberflächen für PRISM-TIRF

Für Messungen von Wechselwirkungen zwischen EYFP-12HB-DNA-Teststrukturen und Alexa647-markierten Nanoantikörpern wurde Mikroskop 2 von Objektiv-TIRF auf PRISM-TIRF umgebaut (s. Kapitel 4.3.2, PRISM-TIRF). Dies lag im Wesentlichen daran, dass Alexa647-Nanoantikörper in hoher Konzentration (1 nM) mit passivierten Lab-Tek-Oberflächen massiv unspezifisch wechselwirkten. In PRISM-TIRF werden spezielle Durchflusskammern benutzt, deren chemische Passivierung eine bessere Qualität hat als die von Lab-Teks. Diese Kammern setzten sich aus einem chemisch behandelten Deckglas

und Quarzobjektträger und aus dazwischenliegenden Parafilmstreifen zur Ausbildung von Kammerwänden zusammen. Die Probe wurde auf den Quarzobjektträgern immobilisiert. Passivierung basiert auf dem Einsatz von PEG-Polymer (Polyethylenglykol) [101], das eine stark abweisende Wirkung gegen unspezifische Proteinwechselwirkung mit der benutzten Oberfläche hat. Mit Peroxoschwefelsäure gereinigte und getrocknete Deckgläser sowie Quarzobjektträger wurden mit Aminosilan (A0700, Amchro) behandelt: 300 mL Methanol, 8 mL Aminosilan, 15 mL 100 % Essigsäure, 20 min bei RT. Anschließend wurden sie gründlich mit milliQ-Wasser gereinigt. Im zweiten Schritt wurden Amino-modifizierten Oberflächen mit PEG-Biotin und PEG (1:20, MW 5000, Laysan Bio), die eine NHS-Gruppe enthielten, behandelt (3 h, RT, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,3). Zum Schluss wurden Deckgläser sowie Quarzobjektträger mit milliQ-Wasser gespült, getrocknet und unter Vakuum bei -20 °C aufbewahrt. Die Behandlung mit NeutrAvidin und Immobilisierung von Proben erfolgte und analog zu Kapitel 4.2.2.

#### 4.2.4 Chemische Bedingungen für Einzelmolekülmessungen

Das enzymatische Sauerstoffentzugssystem enthielt 1 mg/mL Glucose-Oxidase (G2133-10KU/Sigma Aldrich), 0,4 (v/v) Katalase (C3155-50MG/Sigma Aldrich), 30 % Glycerin, 12,5 mM KCl in 50 mM Tris, pH 7,5. Für die TIRF-Messungen wurde diese Stocklösung des Sauerstoffentzugssystems im jeweiligen Messpuffer mit 1 % Glucose (w/w) zu einer Konzentration von 10 % (v/v) verdünnt. 20x Stocklösung von  $\beta$ -Mercaptoethanol (ME, Sigma Aldrich) wurde in jeweiligem Tris-Puffer (I-II, s.u.) gelöst, wobei der pH-Wert erst nach ME-Zugabe eingestellt wurde.

(a). Basierend auf Tris-Puffer (I) mit 100 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8 wurden Messungen mit Cyanin-Farbstoffen (Cy5, Alexa647, s. Kapitel 5.1) durchgeführt. COT (Sigma Aldrich) wurde in DMF zu 250 mM gelöst, das zum Schluss auf die Endkonzentration von 2 mM verdünnt wurde. Trolox (2,3 mM, Sigma Aldrich) wurde in Tris-Puffer (I) gelöst und mit 300 nm UV-Licht bestrahlt, bis das molare Verhältnis von TX zu TQ ca. 5,5 betrug. Die Konzentrationsbestimmung lief unter Beobachtung der Absorbanzwerte bei 255 nm mit Nanodrop (Thermo Scientific) [50].

(b). Basierend auf Tris-Puffer (II) mit 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4 wurden EYFP-Messungen durchgeführt (s. Kapitel 5.2).

(c). Für DNA-PAINT-Messungen wurden in Abhängigkeit vom verwendeten Mikroskop 8- oder 6-basige Atto655-DNA-PAINT-Stränge mit einer Konzentration von 5 nM in PBS

(137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ) benutzt. Nutzung von Lab-Tek-Kammern mit BSA-Biotin/NeutrAvidin-Passivierung war trotz hoher Farbstoffkonzentration möglich, da diese kaum unspezifisch mit der Oberfläche wechselwirkten. Die mittlere Raumtemperatur betrug  $22,7 \pm 0,3^\circ\text{C}$ .

## 4.3 Mikroskopaufbau für Einzelmolekülmessungen

### 4.3.1 Objektiv-TIRF

In Abbildung 4.3 ist ein schematischer Aufbau eines Weitfeld-Fluoreszenzmikroskops dargestellt. Parallele Ausleuchtung der Probe erfolgt, indem der Laseranregungsstrahl auf die hintere fokale Ebene des Objektivs fokussiert wird. Dafür ist ein System aus zwei Linsen mit unterschiedlichen Brennweiten ( $f_1 = 12,5\text{ mm}$ ,  $f_2 = 100\text{ mm}$ ) notwendig. Es besteht folgender Zusammenhang zwischen den Brennweiten der Linsen und der Anordnung der optischen Teile:  $2f_2 + f_1$  ist der Abstand zwischen den Linsen 1 und 2 sowie  $d_1 + d_2 = 2f_2$  ist der Abstand zwischen der hintern fokalen Ebene des Objektivs und Linse 2.

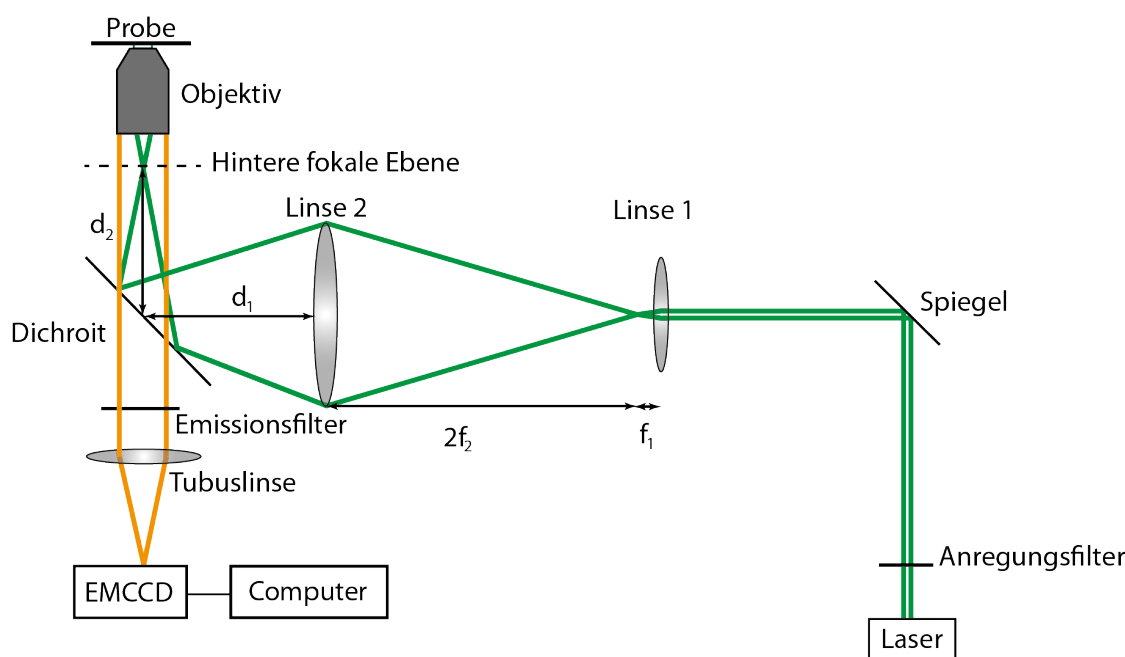


Abbildung 4.3: Schematischer Aufbau eines Weitfeld-Fluoreszenzmikroskops. Die eingezeichneten Farben von Anregung und Emission sind nicht an die in dieser Arbeit benutzten Wellenlängen gebunden.

Das emittierte Licht wird durch einen dichroitischen Strahlteiler und Emissionsfilter vom Anregungslicht getrennt. Die Tubuslinse dient dazu, das kollimierte Emissionslicht auf den Chip einer EMCCD-Kamera zu fokussieren, da das benutzte Objektiv auf unendlich korrigiert ist. Fluoreszenzanregung unter totaler internen Reflektion (TIRF) erfolgt durch Verschiebung des Linsensystems 1-2 senkrecht zur Strahlrichtung, sodass der Anregungslichtstrahl am Rande der Linsen auftrifft. Auf diese Weise ergibt sich eine sogenannte Objektiv-TIRF-Konfiguration.

#### **4.3.2 PRISM-TIRF**

Im Gegensatz zu Objektiv-TIRF erfolgt bei PRISM-TIRF die Anregung der Probe über ein Prisma, das sich oberhalb der Flusskammer befindet [101]. Das Emissionslicht wird dann von unterhalb der Flusskammer mittels eines Wasserobjektivs (60x Olympus NA = 1,2) gesammelt. Zusätzlich wurde ein Optosplit (TripleSplit, Cairn) in den Detektionskanal eingebaut, in dem sich entsprechende Emissionsfilter und ein Dichroit befanden (s. Abbildung 4.5). Dadurch konnten simultane bispektrale Aufnahmen unter Anregung mit 488 nm und 639 nm gemacht werden.

#### **4.3.3 EMCCD-Kamera**

In der Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie werden Videos aufgenommen, die aus mehreren Bildern bzw. Frames bestehen. Die Framedauer ist an die gesetzte Integrationszeit gebunden. Die Integrationszeit ist relativ frei wählbar (ms-s) und besagt, wie lange ein Fluoreszenzsignal innerhalb eines Bildes akkumuliert wird. Üblicherweise werden EMCCD-Kameras eingesetzt, die die Lichtsignale in elektrische Signale umwandeln. Die Detektoroberfläche (s. Abbildung 4.4) ist ein Chip, der aus einem Aufnahmebereich (image area) mit lichtempfindlichen Halbleiterdioden (Pixel) besteht.

Diese Pixel sind in 512 Reihen und 512 Spalten angeordnet, wobei jedes Pixel eine nominale Größe von  $16 \times 16 \mu\text{m}^2$  hat. In Abhängigkeit von der Intensität des einfallenden Lichts werden in jedem Pixel innerhalb der Integrationszeit unterschiedliche Elektronenladungen infolge des inneren photoelektrischen Effekts erzeugt. Die aufgenommenen Signale werden in den lichtunempfindlichen Zwischenspeicher (storage area) als Ladungsbild vertikal verschoben und dort temporär gespeichert (Frame-Transfer-Technik). Innerhalb dieses Transfers vom Aufnahmebereich in den Zwischenspeicher ist die Kamera für eine weitere Signalaufnahme blockiert (Totzeit). Die Transferdauer steigt mit zunehmender

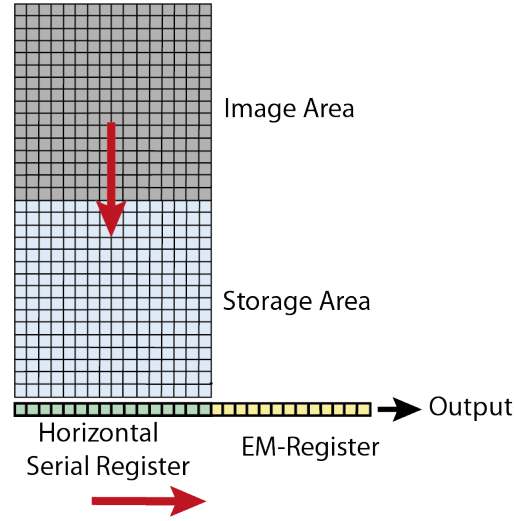


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung der Funktionsweise einer EMCCD-Kamera

Zeilenzahl im sogenannten ROI (range of interest) des Bildaufnahmebereichs und kann durch die Parameter wie z.B. vertical shift speed variiert werden. Während das nächste Bild aufgenommen wird, wird das zwischengespeicherte ausgelesen. Zum Schluss werden die Zeilen mit Ladungspaketen aus der Storage Area mittels eines Schieberegisters zum electron multiplying (EM) Register horizontal transportiert und mit dem sogenannten EM-Gain-Faktor verstärkt. Alle EMCCD bzw. CCD Kameras generieren ein bestimmtes Rauschen beim Ausleseprozess. Liegt die aufgenommene Signalintensität unterhalb eines Grenzwertes, so kann dieses Signal vom Hintergrundrauschen nicht mehr unterschieden werden. Das obenerwähnte EM-Register dient dazu, das aufgenommene Signal noch vor dem Auslesen mittels Stoßionisation zu verstärken. So können auch schwache Signale von der EMCCD-Kamera wahrgenommen werden.

Die finale Pixelgröße  $P$  hängt von der nominalen Pixelgröße  $P_0$  des Kamerachips und der optischen Vergrößerung des Mikroskops  $M$  ab. Die Vergrößerung des Mikroskops wird durch die Vergrößerung des Objektivs  $M_{\text{objektiv}}$  und der jeweiligen Brennweite der eingesetzten Tubuslinse bestimmt (s. Gleichungen 4.1- 4.2). So bezieht sich z.B. ein 100x unendlich korrigiertes Olympus-Objektiv auf die handelsübliche Olympus-Tubuslinse mit  $f_{\text{tubuslinse}} = 180 \text{ mm}$ , die in einem industriell hergestellten Olympus-Mikroskopkörper eingebaut ist.

$$P = \frac{P_0}{M} \quad (4.1)$$



$$M = \frac{f_{\text{tubuslinse}}}{f_{\text{objektiv}}} \quad (4.2)$$

Weitere Vergrößerungslinsen im Mikroskopkörper und Optosplit können die effektive Vergrößerung beeinflussen.

#### 4.3.4 Aufnahmebedingungen für Einzelmolekülmessungen

In Abbildung 4.5 sind die wichtigsten Bestandteile der benutzten Objektiv-TIRF-Mikroskope aufgelistet. 1 und 2 sind Eigenbaumikroskope und 3 ist ein kommerziell erworbenes Mikroskop (Leica, 3D-GSD). Eine speziell angefertigte Objektivhalterung (nosepiece stage, IX2-NPS, Olympus, Mikroskop 1 und 2) und ein aktiv stabilisierender optischer Tisch (TS-300, JRS Scientific Instruments, Mikroskop 1 und 3) wurden benutzt, um den Mikroskop- und Probendrift zu minimieren. Für Experimente mit EYFP (s. Kapitel 5.2)

#	Mikroskopkörper	Objektiv	Laser	Dichroite	Anregungsfilter	Emissionsfilter	EMCCD
1	Olympus IX71, 1,6x M	100x, Öl, NA = 1,4 UPlanSApo/Olympus	405-488-644 nm Diodenlaser iBeamsmart/Toptica Photonics	zt 647 rdc Chroma; Di01R-488 Semrock; zt405/488/561/640 rpc, AHF	650/13 Brightline HC Semrock; 488/1,9 AHF	700/75 ET Chroma; 531/40 Brightline HC Semrock	Andor IXon X3 DU-897
2	Olympus IX71, 1,6x M	100x, Öl, NA = 1,4 UPlanSApo/Olympus	488-639 nm Diodenlaser iBeamsmart/Toptica Photonics	640 DCXR, Chroma	642/10 Brightline HC Semrock	647 Langpassfilter Semrock; 531/46 Bandpassfilter AHF	Andor IXon DU-789
3	Leica GSD	160x, Öl, NA = 1,43 Leica HXC PL APO	642 nm Faserlaser MTB Communications	Filterwürfel 647 HP-T, Leica	Filterwürfel 647 HP-T Leica	Filterwürfel 647 HP-T, Leica	Andor IXon Ultra 897

Abbildung 4.5: Charakterisierung von verwendeten TIRF-Mikroskopen

und Cyanin-Farbstoffen (Alexa647/Cy5, s. Kapitel 5.1) wurde überwiegend Mikroskop 1 verwendet (EM-Gain: 200- 400 und Integrationszeit 30 ms). Die Videolänge für Untersuchungen von Alexa647/Cy5-Kinetik betrug 2.500 Frames und zu Superauflösungszwecken 7.500 Frames. Bei TIRF-Messungen von EYFP-12HB-Teststrukturen (100- 160 nm) zu Superauflösungszwecken wurden Videos mit einer Länge von 8.000 Frames aufgenommen. Für die sequentiellen 2-Farben-Aufnahmen innerhalb eines Videos (Atto647N und dann EYFP, s. Kapitel 5.2.2) wurden elektronisch gesteuerte Shutter (Vincent Associates) benutzt, die extern durch die EMCCD-Kamera mittels einer NI-Karte (National Instruments, USB-6211) getriggert wurden. Für diese Geräteansteuerung wurde eine LabVIEW-basierte Software geschrieben. Die Kamera sendet ein High-Pegel-TTL-Signal während der

Lichtaufnahme in der Image Area und ein Low-Pegel-TTL-Signal während des Transfers in die Storage Area (Totzeit). Diese LabView-basierte Software zählt die Anzahl der fallenden TTL-Flanken und steuert dadurch die Shutter für die Anregung im roten bzw. blauen Bereich an. Für die ersten 4.000 Frames war nur der 644 nm-Laser an, für die nächsten 200 Frames waren beide Laser aus, um den Emissionsfilter und den dichroitischen Strahlteiler zu wechseln. Für die nachfolgenden 4.000 Frames war nur der 488 nm-Laser an. Für TIRF-Aufnahmen von EYFP-12HB-Teststrukturen (100 nm) unter zusätzlicher Benutzung von UV wurden Anregungs- und Aktivierungslaser ebenso alternierend geschaltet (500 Frames mit 488 nm/100 Frames mit 405 nm), da das UV-Licht sonst ein sehr hohes Hintergrundrauschen im blauen Detektionskanal verursacht. Vor der Bestimmung der Lokalisierungen wurden alle Bilder mit UV-Reaktivierung ausgeschnitten. Für 2-Farben-Superauflösungsbilder (EYFP und Alexa647, s. Kapitel 5.2.4) wurde zu einem späteren Zeitpunkt ein zusätzlicher Mehrfarben-Dichroit käuflich erworben. Bispektrale TIRF-Aufnahmen wurden in separaten Videos unter einem Emissionsfilterwechsel sequenziell aufgenommen.

Alle drei Mikroskope wurden für die Kalibrierung bzw. Rückführung von DNA-Origami-Nanolinealen benutzt. Für PAINT-Messungen wurden Laser ( $4 \text{ kW/cm}^2$ ) im roten Anregungsbereich (ca. 640 nm) benutzt, wobei die Videolänge 12.000 Frames, Integrationszeit 50 - 100 ms je nach Mikroskop und EM-Gain 5 betrugen.

## 4.4 AFM

Zur Charakterisierung der DNA-Origami-Nanostrukturen wurde Rasterkraftmikroskopie (AFM, atomic force microscope) mit freundlicher Unterstützung von Enrico Pibiri verwendet. AFM ermöglicht Bildaufnahmen auf der Nanometerskala durch Messungen von atomaren Kräften. Dabei wird eine AFM-Messspitze, die sich auf einem biegsamen Cantilever befindet, über die zu untersuchende Probenoberfläche gescannt. Im Allgemeinen wird die Cantilever-Auslenkung infolge wirkender Kräfte unter Verwendung eines optischen Sensors detektiert. Für die Untersuchung von DNA-Origami-Nanostrukturen wurde der sogenannter intermittierende Betriebsmodus (engl. tapping mode) verwendet, da er für sensible biologische Proben besonders schonend ist. Dabei wird der Cantilever durch eine externe periodische Kraft zu Schwingungen angeregt. Aus den Änderungen der Cantilever-Oszillation infolge der Wechselwirkung mit der Probe können Rückschlüsse auf die Topologie der Probe gezogen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein NanoWizard3 Ultra AFM-Mikroskop (JPK Instruments AG, Berlin) und Cantilever (Olympus (BL-AC40TS-

C2) verwendet. Aufgereinigte DNA-Origami-Proben wurden 1:3 mit 1x TAE-Puffer verdünnt und über  $\text{Ni}^{2+}$ -vermittelte elektrostatische Wechselwirkungen an die Glimmer- bzw. Micaoberfläche (PlanoGmbH, Deutschland) gebunden.

## 4.5 Kalibrierung des Objektmikrometers

Die Kalibrierung des Objektmikrometers wurde durch die PTB (Physikalisch-Technische Bundesanstalt) ausgeführt.



Abbildung 4.6: Objektmikrometer bestehend aus einem Glassubstrat mit einer aufgetragenen Teilungsstruktur, die innerhalb des eingezeichneten Kreises liegt.

Zum Kalibrieren des Objektmikrometers (POG Präzisionsoptik Gera, 2 mm breit mit 200 Skalenteilen, s. Abbildung 4.6) wurde ein rückgeführtes kommerzielles Mikroskop Zeiss AXIOTRON benutzt, das durch die PTB modifiziert wurde. Das Objektmikrometer wurde durch Köhlersche Beleuchtungsanordnung über einen Kondensor mit einer numerischen Apertur von  $\text{NA} = 0,9$  ausgeleuchtet und mit Hilfe eines Objektivs der numerischen Apertur  $\text{NA} = 0,9$  sowie einer lateralen Vergrößerung von  $M = 150$  abgebildet. Dazu wurde Licht einer Wellenlänge von 365 nm verwendet. Zum Kalibrieren des Objektmikrometers wurde eine ortsfeste Spaltapertur in die Bildebene vor einem Photomultiplier eingebaut. In der Bildebene war diese Spaltapertur ca.  $3.700 \times 46 \text{ nm}^2$  groß. Die Probe befand sich auf einem Nanopositioniertisch, mit dessen Hilfe das Objektmikrometer interferometer-kontrolliert relativ zur Abtastblende lateral in der Fokalebene bewegt wurde. Zur Messung wurde die Mitte der Abtastblende ca.  $15 \text{ }\mu\text{m}$  oberhalb der Unterkanten der kurzen Teilungsstrukturen platziert (s. Abbildung 5.21). Das transmittierte Licht wurde in Abhängigkeit von der Position des Objektmikrometers detektiert. Zur Identifizierung der Kanten und Abstandsbestimmung wurde ein Schwellenwert von 50 % maximaler Helligkeit angewandt. Es wurde der mittlere Abstand zwischen den benachbarten linken oder rechten Kanten

der Teilungsstriche (also innerhalb des Spaltapertur-Bereichs) für insgesamt 13 erste Teilungsstriche bestimmt. Dazu wurden insgesamt 5 Messreihen mit jeweils mindestens 10 Wiederholungen durchgeführt, so dass sich jeder Mittelwert aus 50 Einzelmessungen ergab. Da das Objektmikrometer sowohl strukturelle Mängel der Teilungsstriche als auch Verunreinigungen aufwies, wurden deren Beiträge zur Messunsicherheit auf 15 nm ( $k = 1$ ) geschätzt. In Tabelle 4.1 sind mittlere Abstände zwischen den Teilungsstrichen mit entsprechenden, erweiterten Messunsicherheiten ( $k = 2$ ) nach GUM berechnet.

Tabelle 4.1: Mittlere Abstände ( $s_{ref}$ ) zwischen den jeweiligen Kanten benachbarter Teilungslinien mit erweiterten Messunsicherheiten ( $u$ ) für  $k = 2$ .

	Links	Links	Rechts	Rechts
Linie	Messwert ( $\mu\text{m}$ )	$u$ ( $\mu\text{m}$ )	Messwert ( $\mu\text{m}$ )	$u$ ( $\mu\text{m}$ )
2-1	10,018	0,030	10,046	0,030
3-2	10,037	0,030	10,000	0,030
4-3	9,999	0,030	9,988	0,030
5-4	9,996	0,030	10,024	0,030
6-5	10,015	0,030	9,992	0,030
7-6	9,992	0,030	9,980	0,030
8-7	9,974	0,030	10,003	0,030
9-8	9,996	0,030	9,987	0,030
10-9	9,973	0,030	10,006	0,030
11-10	10,032	0,030	10,022	0,030
12-11	10,046	0,030	9,996	0,030
13-12	9,989	0,030	9,967	0,030

## 4.6 Pixelgrößenbestimmung

Für die Messungen von EYFP und Alexa647 (s. Kapitel 5.1 und 5.2) wurde die theoretische Pixelgröße als Näherung genommen. Die gesamte Mikroskopvergrößerung betrug  $M = 160$ , was eine theoretische Gesamtpixelgröße eines EMCCD-Chips ( $P_0 = 16 \mu\text{m}$ ) von 100 nm ergab (s. Gleichung 4.1). Dieser Wert wurde anhand einer kurzen Messung mit einem Objektmikrometer in einem Durchlicht-Mikroskopverfahren mittels einer Weißlichtquelle bestätigt (s. Abbildung 4.7 a). Eine Quantifizierung der Messgenauigkeit der Pixelgröße wurde an dieser Stelle unterlassen, da es nur um eine Abschätzung ging und metrologische Rückführbarkeit nicht erforderlich war. Um DNA-Origami-Nanometerlineale rückführbar zu kalibrieren, wurde eine genauere Pixelgrößenbestimmung sowie Betrachtung

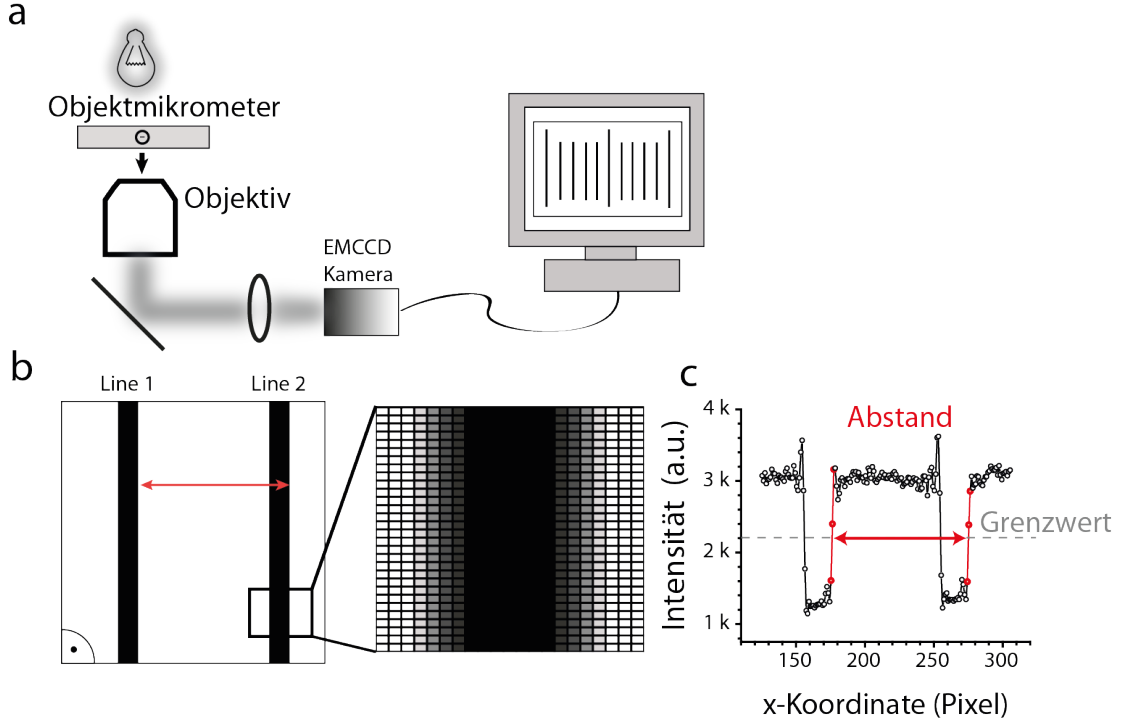


Abbildung 4.7: (a) Aufbau eines Weitfeldmikroskops mit Durchlichtbeleuchtung zum Ermitteln der mittleren Pixelgröße des EMCCD-Kamerachips. (b) Da die Linienkanten unscharf abgebildet waren, wurde ein kontrastbasierter Algorithmus (c) zur Erkennung der Kanten angewandt.

tung der Messunsicherheit durchgeführt. Die Beleuchtung der Probe erfolgte wie oben beschrieben. Zum Kalibrieren wurde eine mittlere Pixelzahl zwischen den Linien 1 und 2 (linke Kanten, s. Tabelle 4.1) bestimmt. Nur der Bereich des Objektmikrometers wurde betrachtet, der auch im oben erwähnten Messfenster, definiert durch die Spaltapertur s.o., lag. Zur Kantenerkennung wurde ein ähnlicher kontrastbasierter Algorithmus angewandt wie von der PTB. Es wurde die mittlere Helligkeit zwischen den Strichen ( $I_{hell}$ ) und der Mitte entlang des Striches ( $I_{dunkel}$ ) gemessen. Der Grenzwert wurde nach Gleichung 4.3 ermittelt.

$$Grenzwert = \frac{I_{hell} - I_{dunkel}}{2} \quad (4.3)$$

Innerhalb des Messfensters wurden für alle Pixelzeilen die Kantenpositionen durch die Über- bzw. Unterschreitung dieses Grenzwertes detektiert. Für eine möglichst genaue Positionsbestimmung wurde jeweils eine lineare Funktion  $I(x) = mx + I_0$  durch das entsprechende Pixel sowie beide benachbarten Pixel gelegt. Die Kantenposition wurde dann

entsprechend dieser Funktion als der Wert  $x$  zur Grenzintensität bestimmt. Die Kantenabstände innerhalb einer Zeile wurden aus der Differenz der bestimmten Positionen entsprechender benachbarter Kanten ermittelt. Für den Abstand aus einem Bild wurden zunächst die Abstände aus allen Pixelzeilen im Messfenster gemittelt (s. Abbildung 4.7 c). Eine mittlere Pixelzahl  $d_{\text{mittel}}$  zwischen den Linien 1 und 2 wurde dann aus 100 Bildaufnahmen bestimmt.

## 4.7 DNA-Origami-Abstandsrechnung

Das Design von DNA-Origami-Nanostrukturen wurden softwaregestützt (caDNAano, Version 2.2.0.) gestaltet. In einem rechteckigen DNA-Origami (s. Abbildung 4.8 a) [84] wurde der Scaffold-Strang (blau, s. Abbildung 4.8 b-c) mit DNA-Staples (schwarz, s. Abbildung 4.8 b-c) in 24 parallele Helices angeordnet. Zur Abstandsabschätzung wird der Abstand

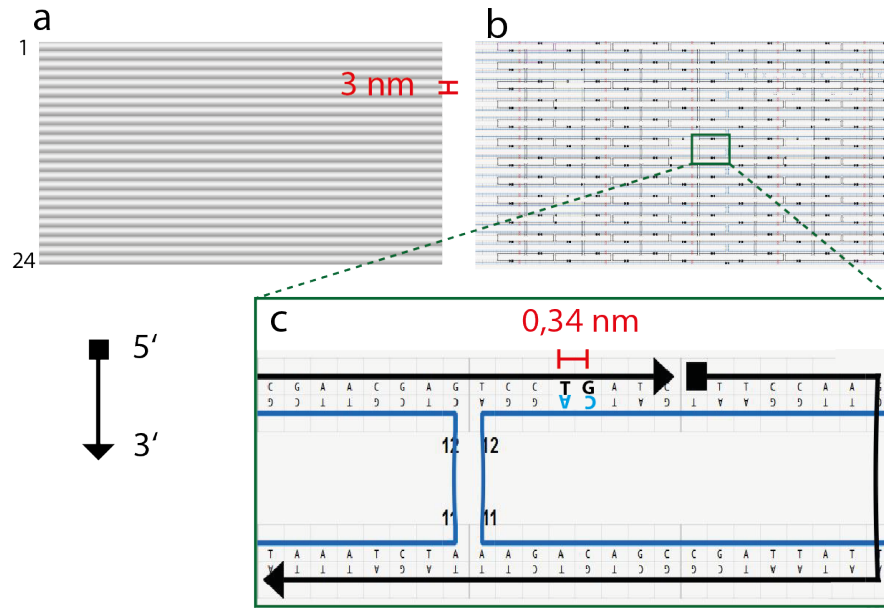


Abbildung 4.8: Rechteckige DNA-Origami-Struktur besteht aus 24 Helices und (b-c) die entsprechende caDNAano-Darstellung aus Scaffold (blau) und DNA-Staples (schwarz). Der Abstand zwischen den Zentren der Helices beträgt 3 nm und zwischen den Basen innerhalb einer Helix 0,34 nm.

zwischen zwei benachbarten Basen von 0,34 nm innerhalb einer Helix herangezogen. Befinden sich also Fluoreszenzmarkierungen innerhalb einer Helix, lässt sich ihr Abstand relativ leicht berechnen. Der Abstand zwischen den Zentren der benachbarten Helices beträgt 3 nm. Zur Abstandsabschätzung zwischen Farbstoffen aus unterschiedlichen Helices

kann der Satz des Pythagoras benutzt werden. Zum externen Markieren werden DNA-Staples am 3'-Ende mit entsprechender Ankersequenz verlängert. Für Superauflösungsmikroskopie mit Alexa647-markierten rechteckigen Origami-Strukturen befanden sich die Ankerstränge für Alexa647-DNA pro Markierungsspot diagonal zueinander, wobei jeder Markierungsspot aus 3 Ankersträngen im Abstand zwischen 9 nm bis 6 nm bestand. Mittelung aller Abstände zwischen den Ankersträngen aus unterschiedlichen Markierungsspots ergab einen theoretischen Wert von 96 nm.

In einem 12-Helixbündel-DNA-Origami [84] ist der Scaffold in 12 parallele Linien angeordnet (Abbildung 4.9 a-b). Die DNA-Staples aus den äußeren Helices wurden an ihrem 3'-Ende zum Anbinden von EYFP-DNA-Konjugaten verlängert (s. Abbildung 4.9 a, Querschnittsansicht, gelb), wobei Helix 4 nur für die Biotin-modifizierten DNA-Staples vorgesehen war. Diese Ankerstränge wurden innerhalb von drei Bereichen (Abbildung 4.9 b, gelb) positioniert, die ca. 21 nm breit waren. Die Mitte/Mitte-Abstände betrugen 100 nm und 160 nm.

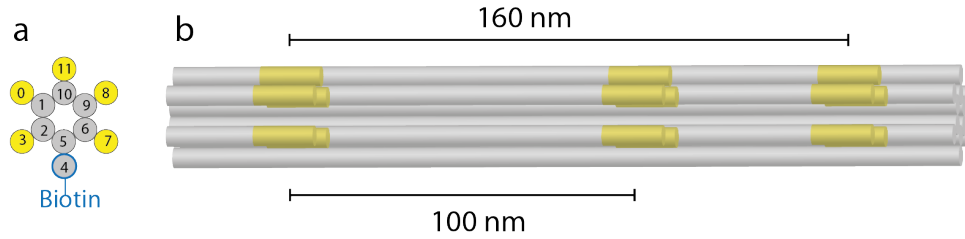


Abbildung 4.9: Querschnitt (a) und frontale Ansicht einer 12-Helixbündel-DNA-Origami-Struktur (b), die mit DNA-Ankersträngen zum Anbinden von EYFP-DNA mit einem Mitte/Mitte-Abstand von 100 nm und 160 nm ausgestattet ist. Die Anzahl dieser Ankerstränge betrug 19, 16, 18 (von links nach rechts).

## 4.8 Auswertung

### 4.8.1 Spoterkennung

Um Fluoreszenzfarbstoffe in allen beugungsbegrenzten Videos, die in Rahmen dieser Arbeit aufgenommen wurden, zu identifizieren, wurde ein Spoterkennungsalgorithmus angewandt [102]. Er beruht auf dem Prinzip der relativen Helligkeit (s. Abbildung 4.10) und betrachtet jedes einzelne Pixel innerhalb der ROI. Wenn die mittlere Intensität des zentralen Pixels (dunkel rot) und seiner unmittelbaren Umgebung (rosa) um ein Vielfaches (Kontrastwert) die mittlere Intensität der fernen Umgebung (grauer Pixelrand)

übersteigt, wird dieses Pixel (dunkel rot) für die weitere Analyse berücksichtigt. Alle Pixel, die diese Bedingung erfüllen, werden mit der Zahl 1 versehen, ansonsten mit 0. Auf diese Weise entsteht eine Matrix aus Einsen und Nullen. Eine Pixelgruppe wird dann aus den benachbarten Matrixelementen gebildet, wenn sie ausschließlich Einsen beinhalten. Im nächsten Schritt wird ein Schwerpunkt jeder Pixelgruppe (Spot) ermittelt.

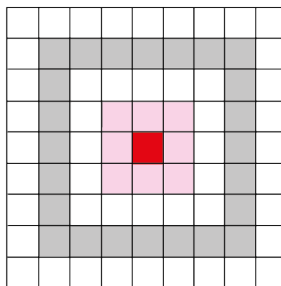


Abbildung 4.10: Spoterkennung mittels relativer Helligkeit für jedes einzelne Pixel (dunkel rot) in ROI unter Berücksichtigung der unmittelbar benachbarten Pixel (rosa) und der weiter entfernten Pixel als Hintergrundreferenz (grau).

#### 4.8.2 Auswertung der Fluoreszenzspuren

Für photophysikalische Untersuchungen (s. Kapitel 5.1 und 5.2) wurden Rohdaten im TIFF-Format mithilfe der Andor Solis v4.13.3-Software aufgenommen und hauptsächlich mit einer LabVIEW-basierten Software DualVIEW/TripleVIEW [103] ausgewertet. Zum Generieren von Fluoreszenzspuren wird zunächst eine bestimmte Anzahl der anfänglichen Videoframes (max. 50) aufsummiert. Auf das resultierende Bild wird der Spot-erkennungsalgorithmus (s.o.) mit einem Kontrastwert von 1,6 angewandt. Die ermittelten Schwerpunktskoordinaten werden zur Gewinnung der Zeitabhängigkeit der Spot-Fluoreszenzintensität innerhalb des gesamten Videos betrachtet, die als Fluoreszenzspur bezeichnet wird. Im nächsten Schritt findet eine Hintergrundkorrektur der Spuren statt. Um die Koordinaten des ermittelten Schwerpunkts wird ein Polygon (schwarz) gelegt, das im Zentrum eines 9x9-Rechtecks liegt (s. Abbildung 4.11 a-b). Alle Pixelintensitäten innerhalb des Polygons tragen zur gesamten Spot-Signalintensität bei. Die mittlere Intensität des resultierenden grauen Randes wird zur Berechnung des Hintergrunds herangezogen. Um die Intensität des Spots gegen das Hintergrundrauschen zu korrigieren, wird von seiner mittleren Intensität die des Hintergrunds abgezogen.

Die Unterscheidung zwischen An- und Auszustand im Falle von blinkenden Fluoreszenz-



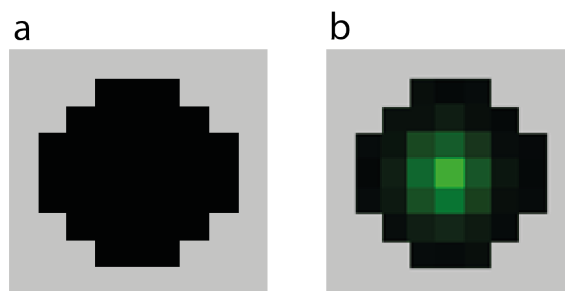


Abbildung 4.11: Hintergrundkorrektur von Fluoreszenzspuren. (a) Ein schwarzes Polygon befindet sich in einem 9x9-Rechteck. Alle Pixel innerhalb dieses Rechtecks, die das Polygon nicht enthalten, stellen die Hintergrundpixel dar. (b) Der Spot-schwerpunkt (grün) befindet sich im Zentrum des Polygons, dessen Pixel zur Signalintensität beitragen [98].

molekülen (s. Kapitel 5.1 und 5.2) erfolgte auch durch diesen Spoterkennungsalgorithmus, wobei er auf alle Frames eines Videos angewandt wurde. Daraus wurde eine binäre Spur ( $1 = \text{An}$ ,  $0 = \text{Aus}$ ) für jedes Farbstoffmolekül generiert. Für die weitere Datenauswertung wurde eine ergänzende LabVIEW-basierte Software geschrieben, in der die binären mit den tatsächlichen Fluoreszenzspuren überlagert wurden. Daraus werden Kinetikdaten wie z.B. Dauer der An- und Aus-Zustände sowie entsprechende Fluoreszenzintensitäten pro Anzustand extrahiert. Die extrahierten Kinetikdaten aller Farbstoffe pro Pufferbedingung werden in einem Histogramm zusammengefasst und gefittet, um mittlere Werte erhalten zu können.

#### 4.8.3 Bildgenerierung in der LB-Superauflösungsmikroskopie

Alle Rohdaten für LB-Superauflösungsmikroskopie wurden mithilfe der  $\mu\text{M}$ -Manager/ImageJ-Software mit TIFF als Datenformat aufgenommen. Um Lokalisierungen für Superauflösungsmikroskopie zu erhalten, wurde eine MATLAB-basierte Software benutzt [104, 84]. Dabei wurde der o.g. Spoterkennungsalgorithmus auf jedes beugungsbegrenzte Frame ebenso angewandt. Um den gewonnenen Schwerpunkt wird ein Rechteck bestehend aus 8x8 Pixeln ausgeschnitten. Dieser Bereich wird mit einer 2D-Gauß-Funktion angefitet, um die Koordinaten des PSF-Zentrums (Lokalisierung) zu bestimmen. Die Koordinaten des PSF-Zentrums wurden zunächst mit Pixellängen als Einheit bestimmt. Zunächst liefert diese Matlab-basierte Software eine Textdatei entsprechender Koordinaten mit zugehörigen Bildnummern und Intensitäten (integriert über den erkannten Spot und anschließend hintergrundkorrigiert). Die Umrechnung der Längenskala in Nanometer findet durch die Bestimmung der Pixelgröße in der Bildebene statt. Aus den gewonne-

nen Lokalisierungen wird ein zweidimensionales Farbhistogramm mit einem Binning von 7-10 nm generiert, das gleichzeitig auch das supraaufgelöste Bild darstellt. Diese Bildrekonstruktion und Auswertung der supraaufgelösten Daten (s.u.) wurde mithilfe einer LabVIEW-basierten Software ausgeführt [84].

#### 4.8.4 Automatische Abstandsbestimmung

Das Prinzip der im Rahmen dieser Arbeit angewendeten automatische Abstandsbestimmung von Doppelspots auf Basis von DNA-Origami-Nanometerlinealen bzw. Referenzproben stammt von Dr. Carsten Forthmann [84, 102]. Der Algorithmus besteht in Erstellung eines Histogramms der Abstände, die zwischen allen Lokalisierungen innerhalb eines Doppelspots berechnet wurden (s. Abbildung 4.12 a). Diese Verteilung ( $f(x)$ , Abbildung 4.12 b, grau) ist eine Überlagerung zweier Verteilungsfunktionen ( $v(x)$ ,  $g(x)$ ) mit jeweils einem Maximum. Die erste Verteilung  $v(x)$  entspricht den Abständen innerhalb einer Markierung bzw. Lokalisierungswolke, wobei die zweite Verteilung  $g(x)$  den Lokalisierungsabständen zwischen den Lokalisierungswolken entspricht. Die  $v(x)$ -Verteilung lässt sich mit einer 2D-Maxwell-Boltzmann-Verteilung (rot in Abbildung 4.12 b, Gleichung 4.4) und  $g(x)$  mit einer Gauß-Verteilung (grün in Abbildung 4.12 b, Gleichung 4.4) beschreiben.

$$f(x) = v(x) + g(x) = ax \cdot \exp(-bx^2) + h \cdot \exp\left(-\frac{(x - \mu)^2}{2\sigma^2}\right) \quad (4.4)$$

Durch Anpassung der experimentell gewonnenen Gesamtverteilung durch Gleichung 4.4 kann der Abstand zwischen zwei Markierungen extrahiert werden, der dem Parameter  $\mu$  in Gleichung 4.4 entspricht.

Alle so erhaltenen Abstände aus einer oder mehreren Messungen wurden anschließend histogrammiert und mit einer Gauß-Funktion angefitet. Abstandsfehler wurden häufiger in Form von Gauß-Standardabweichung angegeben.

Das dargestellte Modell (Gleichung 4.4) ist eine Näherung und funktioniert am besten, wenn der aufzulösende Abstand deutlich größer ist als die Standardabweichung die Lokalisierungswolke pro Markierung. Für kürzere Abstände ist jedoch Gleichung 4.5 ein besseres Modell für die Abstandsbestimmung, das mit dem Term  $\sqrt{x}$  ergänzt ist. Gleichung 4.5 wurde für die Datenauswertung in Kapitel 5.3 zur Rückführung der DNA-Origami-Strukturen eingesetzt.

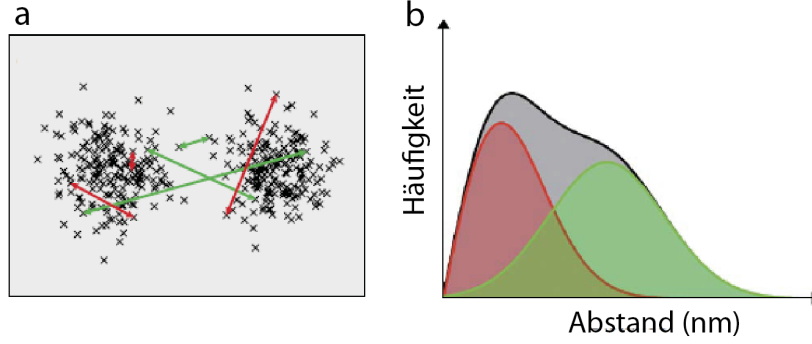


Abbildung 4.12: Automatische Abstandsbestimmung eines Doppelspots. (a) Abstandsbestimmung zwischen allen Lokalisierungen innerhalb zwei Lokalisierungswolken: intra (rot) und inter (grün). (b) Daraus folgende Gesamtabstandsverteilung (grau) beinhaltet eine Abstandsverteilung innerhalb von beiden Spots (rot) und zwischen den Spots (grün). Um den Abstand zwischen den Lokalisierungswolken zu bestimmen, wird die Verteilung in grau mit Gleichung 4.4 angefitet ( $\mu = \text{Abstand}$ ) [84].

$$f(x) = v(x) + g(x) = ax \cdot \exp(-bx^2) + h\sqrt{x} \cdot \exp\left(-\frac{(x - \mu)^2}{2\sigma^2}\right) \quad (4.5)$$

#### 4.8.5 Monte-Carlo-Simulationen

LabVIEW-basierte Monte-Carlo-Simulationen wurden von Mario Raab ausgeführt. Als erstes wurden TIRF-Rohdaten simuliert, indem sich jedes einzelne Photon der Gesamtheit  $N$  eines Emitters innerhalb einer Gauß-verteilten Wolke mit einem Zentrum  $(x; y)$  befand. Dabei wurde deren Standardabweichung an die PSF-Standardabweichung bei einer Anregungswellenlänge von 644 nm angepasst. Die Photonenwolke wurde in einem 2D-Histogramm dargestellt, wobei dessen Klasseneinteilung der Pixelgröße glich. Für die Lokalisierungsbestimmung wurde so vorgegangen wie in Kapitel 4.8.3. Um mehrere Emittter zu simulieren, wurden mehrere Gauß-verteilten Wolken mit entsprechenden unterschiedlichen Zentren  $(x_i; y_i)$ , z.B. im Abstand von 30 nm erstellt. Durch Veränderung der Gesamtphotonenzahl ( $N$ ), Blinkkinetik, Anzahl der Lokalisierungen pro Emitter usw. konnten die virtuellen Messbedingen variiert werden.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Kombination eines Redoxsystems (ROXS) mit dSTORM

Durch Kombination von COT als Triplett-Quencher mit der dSTORM-Superauflösungsmethode wurde eine Verdreifachung der Photonenzahl pro Lokalisierung unter Benutzung von Cyanin-Farbstoffen (Alexa647) von Olivier et al. erzielt (s. Kapitel 3.2.2.1). Aufgrund einiger Nachteile von COT (Toxizität, schlechte Wasserlöslichkeit sowie Einsatz von organischen Lösemitteln) wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob ein anderer Triplett-Quencher wie ROXS mit Trolox/Troloxchinon (TX/TQ) eine alternative Methode zur Erhöhung der Photonenzahl darstellt. Diese chemische Zusammensetzung (dSTORM, Trolox/Troloxchinon) wurde schon von Holzmeister et. al im Hinblick auf einige Rhodamin-basierte Farbstoffe (Atto532, Alexa568) untersucht. Dabei wurde eine starke photoprotektive Wirkung mit faktisch abwesendem Blinken nachgewiesen [52]. Photophysikalische Einzelmoleküluntersuchungen von immobilisierten Cyanin-Farbstoffen (Alexa647, Cy5) wurden mithilfe eines TIRF-Mikroskops überwiegend unter gleichzeitiger und kontinuierlicher Beleuchtung mit Anregungs- und Reaktivierungslasern (644/405 nm) ausgeführt.

#### 5.1.1 Photophysikalische Untersuchungen von Cyanin-Farbstoffen unter dSTORM mit ROXS

In Abbildung 5.1 a ist eine typische Fluoreszenzspur von Alexa647 unter dSTORM-Messbedingungen (70 mM ME mit Sauerstoffentzug) dargestellt. Der Farbstoff wechselt zwischen fluoreszenzaktiven und dunklen Zuständen [4, 46]. Die Zugabe von COT [67] erhöht wie erwartet die mittlere Dauer der Anzustände, ohne die der Auszustände signifikant zu beeinflussen (s. Abbildung 5.1 c, g-h). In Kombination mit dSTORM verlängert ROXS tatsächlich die mittlere Dauer von Anzuständen im Vergleich zu dSTORM-Messpuffer ohne Zusätze. Allerdings ist der Einfluss bei geringeren ME-Konzentrationen erstaunlicherweise am stärksten (s. Abbildung 5.1 d, g-h). Dass ME die mittleren Anzustände verkürzt (Abbildung 5.1 d-f, g-h), ist nicht verwunderlich und kann wie folgt erklärt werden: mit steigender Konzentration ist ME verstärkt in der Lage, mit ROXS um die Entvölkerung der Triplett-Zustände zu konkurrieren. Dadurch steigt die Wahrscheinlichkeit, dass neben der geminalen Rekombination auch der Übergang in den langlebigen Dunkelzustand

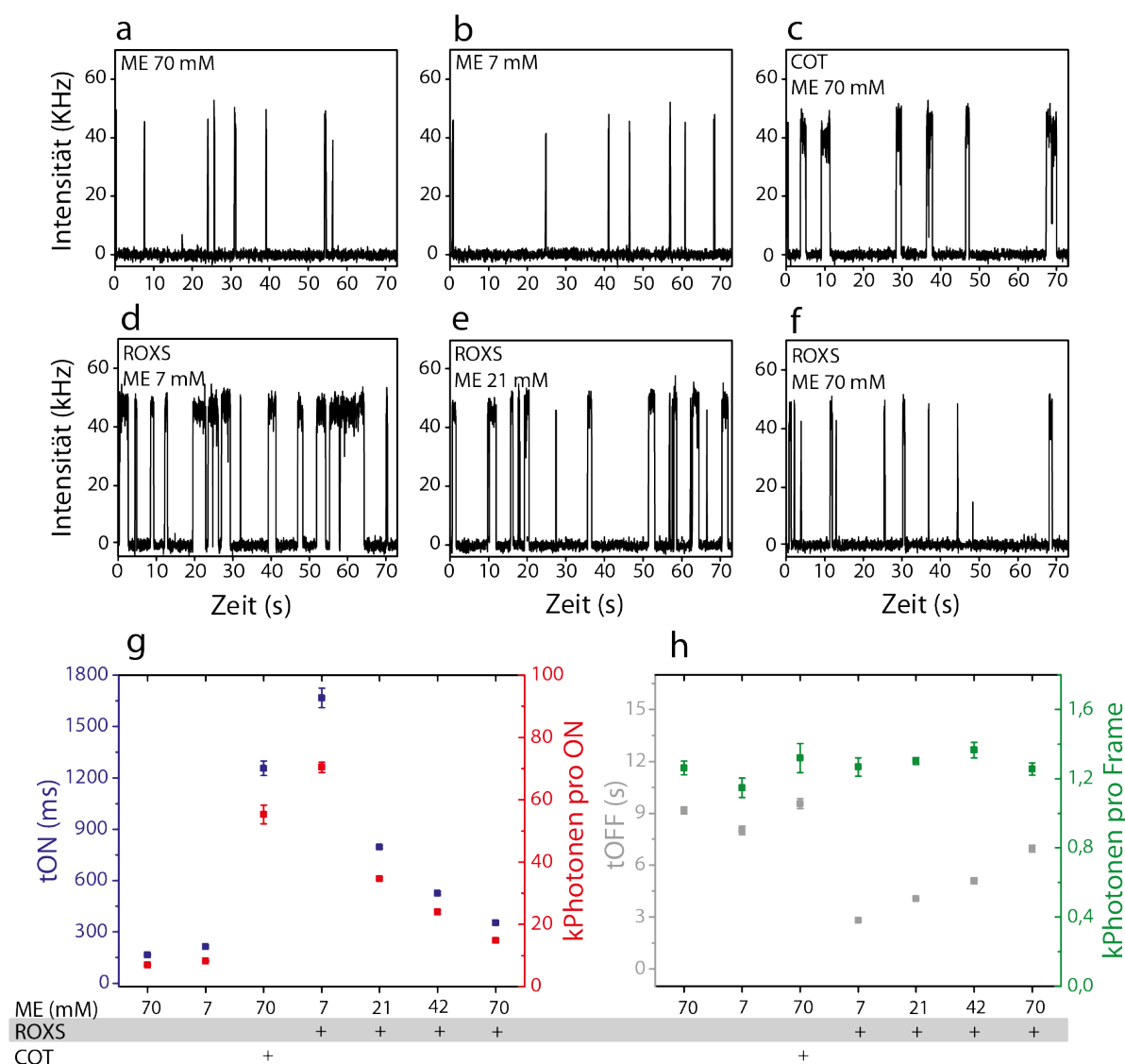


Abbildung 5.1: Charakteristische Einzelmolekül-Fluoreszenzspuren von Alexa647 mit unterschiedlichen chemischen Pufferzusammensetzungen unter einem TIRF-Mikroskop ((a-b) dSTORM, (c) COT/dSTORM, (d-f) ROXS/dSTORM) und deren entsprechende Kinetikdaten: (g) mittlere Dauer der Anzustände ( $t_{ON}$ ) und mittlere Photonenzahl pro Anzustand, (h) mittlere Dauer der Auszustände ( $t_{OFF}$ ) sowie mittlere Photonenzahl pro Videoframe. Dargestellte Fehlerbalken sind Fitfehler aus exponentiellen Anpassungen von Histogrammen der dargestellten Kinetikdaten, die jeweils von über 200 einzelnen Farbstoffmolekülen stammen (s. Abbildungen 9.1 - 9.3). Alle Messungen wurden unter kontinuierlicher Laserbeleuchtung mit 644 nm (ca.  $500 \text{ Wcm}^{-2}$ ) und 405 nm (ca.  $15 \text{ Wcm}^{-2}$ ), mit einer Integrationszeit von 30 ms und unter enzymatischem Sauerstoffzug durchgeführt.

stattfindet. Somit sinkt die Wahrscheinlichkeit für die Wechselwirkung von ROXS mit den Triplett-Zuständen und die Anzustände werden kürzer. Darüber hinaus wird die mittlere

re Dauer der Auszustände mit abnehmender ME-Konzentration kürzer. Diese Abnahme hängt jedoch nicht mit der geringeren ME-Konzentration zusammen (7 mM), denn die dSTORM-Kinetikdaten mit 7 und 70 mM ME weisen kaum Unterschiede auf (s. Abbildung 5.1 b, g-h). Es kann also mit den verwendeten ROXS-Komponenten zusammenhängen. Als erstes wurde ein möglicher Einfluss von UV-Bestrahlung (405 nm) auf die ROXS-Zusammensetzung während TIRF-Messungen untersucht. Wie den Absorptionsspektren (Abbildung 5.2) zu entnehmen ist, fällt die Auswirkung der UV-Bestrahlung (405 nm) während einer Messreihe (ca. 30 min für eine Pufferbedingung) auf die TQ-Bildung unter den TIRF-Aufnahmebedingungen (s. Abbildung 5.1) sehr gering aus. Die Zunahme der TQ-Konzentration betrug 2 %. Dies liegt zum einen daran, dass Trolox kaum bei 405 nm absorbiert und zum anderen, dass der für die Umwandlung von Trolox zu Troloxchinon notwendige molekulare Sauerstoff im Zuge des Sauerstoffentzugs drastisch reduziert wird.

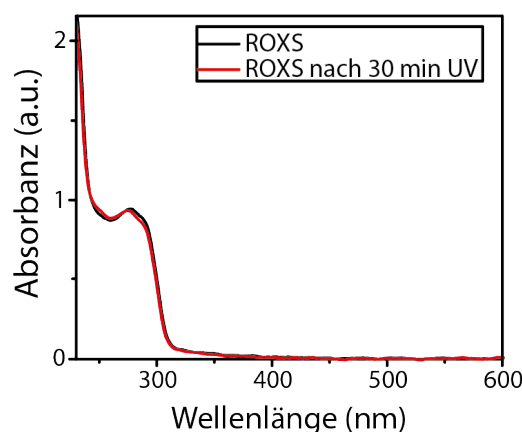


Abbildung 5.2: Einfluss von UV-Bestrahlung (405 nm), der ROXS-System im Laufe von ausgeführten TIRF-Messungen ausgesetzt war (s. Abbildung 5.1). Nach einer 30-minütigen UV-Exposition mit  $15 \text{ Wcm}^{-2}$  stieg die Konzentration von Troloxchinon um geringe 2 %.

Da der reguläre Dunkelzustand unter dSTORM höchstwahrscheinlich infolge einer Addition von einem deprotonierten ME-Molekül an die Doppelbindung der Polymethinkette [5] zustandekommt (s. Kapitel 3.2.2.1), kann die Annahme auf den ersten Blick plausibel erscheinen, dass durch ROXS-Zugabe das enthaltene Oxidationsmittel Troloxchinon den Grundzustand ( $S_0$ ) aus dem regulären dSTORM-Dunkelzustand direkt durch eine Oxidationsreaktion wiederherstellen kann [67] (s. Abbildung 5.1 d). Demnach sollte die Reaktivierung nicht mehr zwingend auf die UV-Beleuchtung angewiesen sein. Diesem direkten Reaktivierungsweg durch Troloxchinon widerspricht jedoch die Tatsache, dass ohne UV-Bestrahlung bei Anwesenheit von ROXS und 7 mM ME kaum Fluoreszenzreaktivierung stattfindet (s. Abbildung 5.3 a-b).

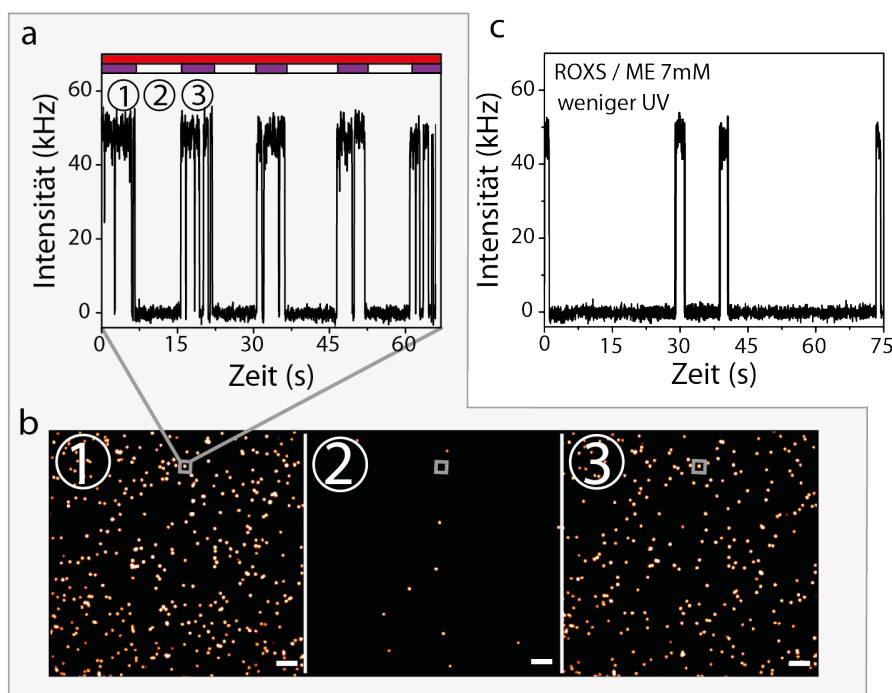


Abbildung 5.3: Einzelmolekülmessungen von Alexa647 unter einem TIRF-Mikroskop mit ROXS/dSTORM (7 mM) ausgeführt unter unterschiedlichen Beleuchtungsbedingungen. (a) Charakteristische Einzelmolekül-Fluoreszenzspur von Alexa647 gemessen unter kontinuierlicher Laseranregung (642 nm) und alternierender UV-Beleuchtung (405 nm) sowie dazugehörige (b) TIRF-Bilder von immobilisierten Farbstoffmolekülen mit Maßstabsbalken von 5  $\mu\text{m}$ . Alternierende UV-Bestrahlung ist als gestrichelte violette Linie und kontinuierliche Beleuchtung mit 642 nm als rote Linie dargestellt. Ohne UV-Beleuchtung werden kaum Alexa647-Moleküle reaktiviert. (c) Charakteristische Einzelmolekül-Fluoreszenzspur von Alexa647 gemessen unter kontinuierlicher Beleuchtung mit 644 nm (ca.  $500 \text{ Wcm}^{-2}$ ) und 405 nm mit geringerer Laserleistung (ca.  $3 \text{ Wcm}^{-2}$ ) im Vergleich zu Abbildung 5.1 d

Nach wie vor wird die Reaktivierung durch das UV-Licht getriggert, was aus dem zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzspur eines exemplarischen Alexa647-Moleküls unter alternierender UV-Bestrahlung deutlich wird (s. Abbildung 5.3 a). Nur wenn Anregungs- und Reaktivierungslicht gleichzeitig an sind, wird das Fluoreszenzsignal detektiert. Ebenso korreliert die Anzahl der Moleküle in den dazugehörigen TIRF-Aufnahmen streng mit der UV-Beleuchtung (s. Abbildung 5.3 b). Dementsprechend lassen sich die Auszustände durch die Bestrahlung mit einer geringeren UV-Laserleistung um das 6-fache verlängern (Abbildung, 5.3 c). Die präsentierten Daten zeigen eindeutig, dass das anwesende Oxidationsmittel Troloxchinon in ROXS und in Kombination mit dSTORM (insbesondere bei niedrigeren ME-Konzentrationen) nicht in der Lage ist, den Dunkelzustand direkt ohne UV-Beleuchtung zu entvölkern. ROXS scheint vielmehr, die Sensitivität der Dunkel-

zustände gegenüber der UV-Reaktivierung zu erhöhen. Eine der möglichen Erklärungen dafür besteht in der Annahme, dass ROXS die Bildung eines zusätzlichen Zwischenprodukts, das leichter UV-reaktivierbar ist, herbeiführen kann. In Übereinstimmung mit den präsentierten Beobachtungen wurde ein Reaktionsmechanismus für die Bildung von Auszuständen vorgeschlagen, der in Abbildung 5.4 schematisch dargestellt ist.

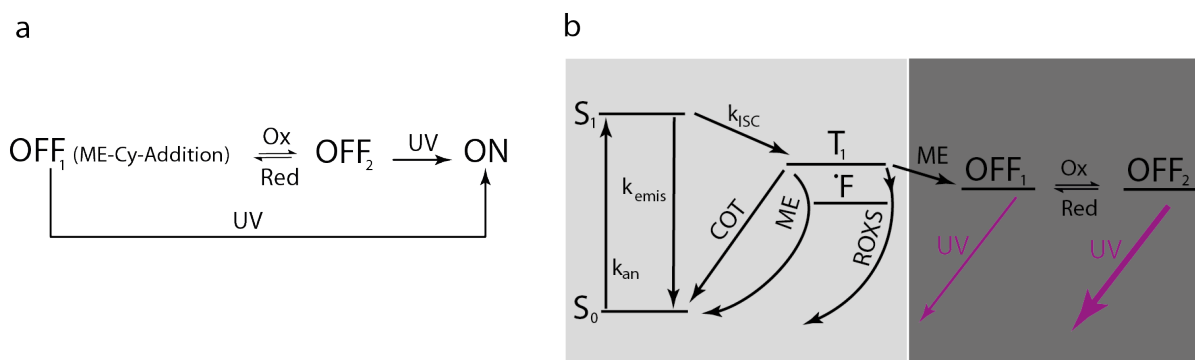


Abbildung 5.4: (a) Vorgeschlagener Mechanismus zur Bildung von Auszuständen unter Verwendung von ROXS (Trolox/Troloxchinon) und dSTORM sowie (b) das entsprechende Jablonski-Diagramm.

Das Gleichgewicht zwischen dem regulären Dunkelzustand infolge der ME-Anlagerung ( $OFF_1$ ) und dem vorgeschlagenen fluoreszenz-inaktiven, UV-sensitiveren Zwischenprodukt ( $OFF_2$ ) wird durch die vorherrschenden Redoxbedingungen im Messpuffer bestimmt. Das Oxidationsmittel begünstigt somit die Bildung des  $OFF_2$ -Zustands, wobei das Reduktionsmittel (z.B. ME) dieses verhindert, sodass der reguläre  $OFF_1$ -Zustand zurückgewonnen wird. Darüber hinaus sind die präsentierten Kinetikdaten monoexponentiell verteilt (s. Abbildungen 9.1 - 9.3). Der vorgeschlagene Reaktivierungsmechanismus (s. Abbildung 5.4) weist ebenso eine monoexponentielle Verteilung für den Fall auf, dass die Reaktionsraten für die Redoxprozesse zwischen  $OFF_1$  und  $OFF_2$  deutlich höher sind als die Rate für die  $OFF_2$ -Reaktivierung. Ergänzend dazu führt eine Verdopplung der Konzentration von Troloxchinon zu einer zusätzlichen Verkürzung der Auszustände um ca. 50 %, wobei die Länge der Anzustände weitgehend konstant blieb (Abbildung 5.5). Hinzufügend lieferten analoge Messungen mit Cy5 unter gleichen chemischen Bedingungen sehr ähnliche Ergebnisse und Abhängigkeiten, denn Cy5 ist strukturell mit dem Alexa647-Farbstoff eng verwandt (s. Abbildung 9.4).

Nachdem die Wechselwirkung zwischen ROXS und dSTORM geklärt ist, wird im nachfolgenden Schritt auf das eigentliche Ziel dieser Untersuchungen eingegangen, und zwar auf die Erhöhung der Photonenzahl pro Lokalisierung bzw. Videoframe im Hinblick auf



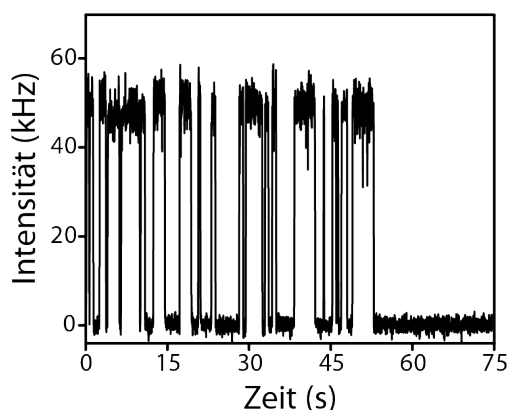


Abbildung 5.5: Charakteristische Einzelmolekül-Fluoreszenzspur von Alexa647 mit ROXS/dSTORM (7 mM ME) gemessen unter gleichen Bedingungen wie in Abbildung 5.1 d, aber mit zweifacher Troloxchinon-Konzentration. Die Auswertung der Kinetikdaten liefert folgende Dauer von An- und Auszuständen:  $t_{ON} = 1,6$  s und  $t_{OFF} = 1,5$  s.

die Anwendung der Superauflösungsmikroskopie. Wie aus Abbildung 5.1 h zu entnehmen ist, blieb die mittlere Photonenzahl pro Videoframe allerdings bei gleichen Laseranregungsleistungen für die untersuchten chemischen Zusammensetzungen (dSTORM, ROXS/dSTORM, COT/dSTORM) sehr ähnlich. Um die Photonenzahl pro Videoframe

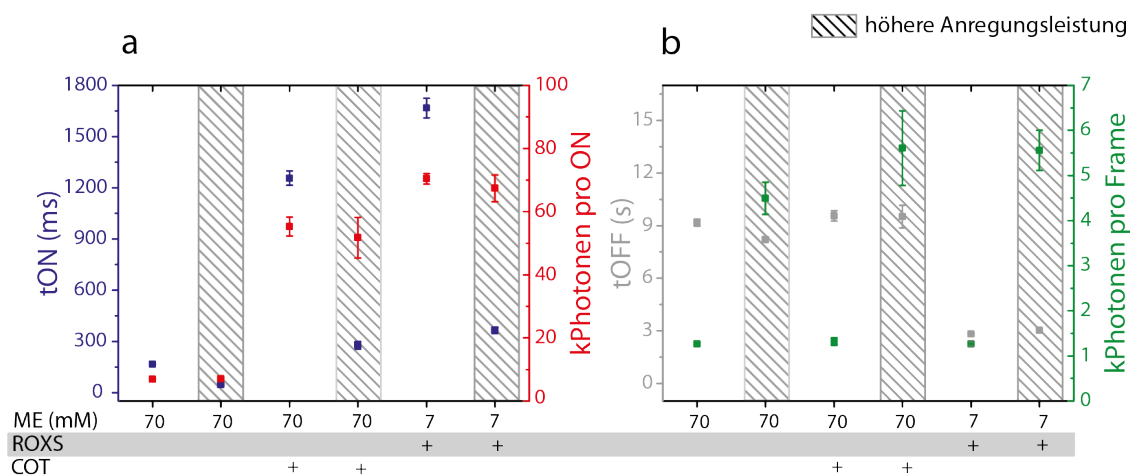


Abbildung 5.6: Zusätzliche Kinetikdaten von Alexa647 mit unterschiedlichen chemischen Pufferzusammensetzungen (dSTORM, ROXS/dSTORM, COT/dSTORM) gemessen an einem TIRF-Mikroskop unter identischen Messbedingungen wie in Abbildung 5.1, aber unter Benutzung von ca. 4-facher 644 nm-Anregungsleistung ca.  $2 \text{ kWcm}^{-2}$  (schraffiert). Dargestellte Fehlerbalken sind Fitfehler aus exponentiellen Anpassungen von Histogrammen der dargestellten Kinetikdaten, die jeweils von über 200 einzelnen Farbstoffmolekülen stammen.

und somit pro Lokalisierung unter gleichen chemischen Bedingungen deutlich zu erhö-

hen, bedarf es somit höherer Anregungslaserleistungen (642 nm). Kürzere Anzustände sind im Allgemeinen für die lokalisierungsbasierte Superauflösungsmikroskopie von Vorteil (s. Kapitel 3.2.2). In Abbildung 5.6 ist die Abhängigkeit der Kinetikdaten von der Anregungslaserleistung dargestellt. Wie erwartet stieg die Photonenzahl pro Videoframe unter höheren Anregungsleistungen um das 4-fache und die mittlere Dauer der Anzustände wurde dadurch kürzer, wobei die mittlere Gesamtphotonenzahl pro Anzustand sowie die mittlere Dauer der Auszustände weitgehend konstant blieben.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass unter Benutzung von höheren Anregungslaserleistungen (644 nm) zugunsten von kürzeren Anzuständen sowie von niedrigeren Reaktivierungslaserleistungen (405 nm) zugunsten von längeren Auszuständen ein für lokalisierungsbasierte Superauflösungsmikroskopie zufriedenstellendes Blinkverhalten mit ROXS/dSTORM-Kombination erreicht werden konnte. Bei gleicher ME-Konzentration erwies sich COT jedoch als effektiverer Triplett-Quencher als ROXS (s. Abbildung 5.1 g).

### 5.1.2 Superauflösungsmikroskopie unter dSTORM mit ROXS

Um nun die Anwendbarkeit der erzielten Ergebnisse auf lokalisierungsbasierte Superauflösungsmikroskopie zu demonstrieren und einen direkten Vergleich mit COT zu erzielen, werden fluoreszenzmarkierte DNA-Origami-Nanostrukturen als Referenz- bzw. Testproben eingesetzt. Ein rechteckiges DNA-Origami ( $90 \times 70 \text{ nm}^2$ ) wurde mit zwei Markierungen im Abstand von ca. 96 nm ausgestattet, wobei jede Markierung jeweils aus drei DNA-Ankersträngen zum Anbinden von Alexa647-markierten DNA-Gegensträngen *via* DNA-Hybridisierung bestand. Darüber hinaus wurden DNA-Origami-Rechtecke jeweils mit 6 weiteren Biotin-Molekülen markiert, um die zu untersuchende Probe auf einem chemisch modifizierten Mikroskopdeckglas in gewünschter Dichte zu immobilisieren (s. Kapitel 4.2.2). Wie es in Abbildung 5.7 dargestellt ist, konnten superaufgelöste Strukturen in Form von Doppelspots unter allen drei chemischen Bedingungen erhalten werden. Die ermittelten mittleren Abstände zwischen den aufgelösten Markierungen betrugen jeweils  $(94 \pm 5 \text{ nm})$ ,  $(93 \pm 6 \text{ nm})$  und  $(95 \pm 5 \text{ nm})$  für dSTORM, ROXS/dSTORM und COT/dSTORM und sind damit um wenige Prozent kürzer als der theoretisch abgeschätzte Abstand von 96 nm (s. Abbildung 9.5). Darüber hinaus konnte die Lokalisierungsgenauigkeit in Form einer Halbwertsbreite (FWHM) von 17,1 nm (dSTORM) auf 10,9 nm bzw. 10,8 nm (ROXS/dSTORM bzw. COT/dSTORM) verbessert werden (s. Abbildung 5.7 c, g, k). Diese Verbesserung spiegelt sich automatisch in der erhaltenen mittleren Photonenzahl pro Lokalisierung wider, die um den Faktor 3 im Vergleich zu dSTORM-Bildern

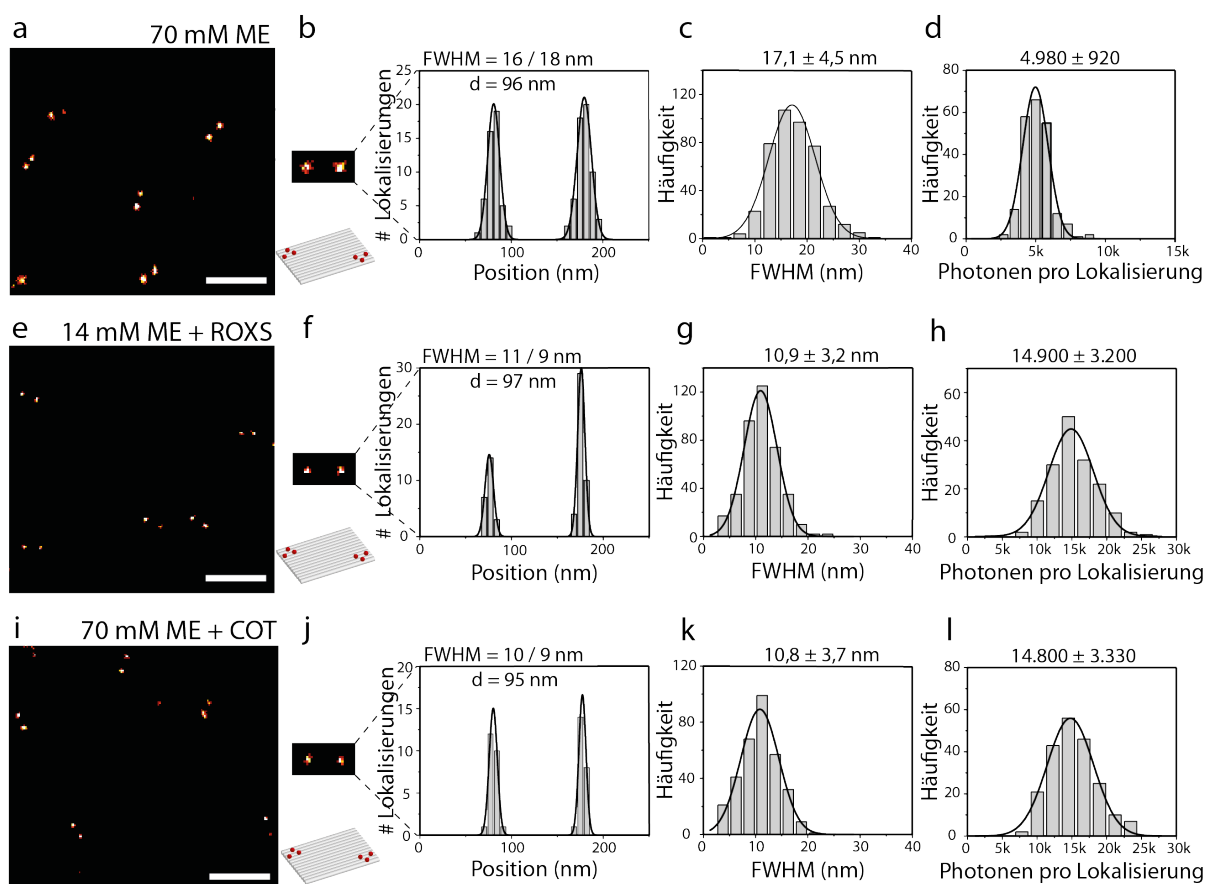


Abbildung 5.7: Superauflösungsmikroskopie von rechteckigen DNA-Origami-Nanostrukturen mit jeweils zwei Fluoreszenzmarkierungen im Abstand von ca. 96 nm unter kontinuierlicher Anregungslaserbeleuchtung mit 644 nm ( $2,4\text{--}5,5\text{ kWcm}^{-2}$ ) und Reaktivierungslaserbeleuchtung mit 405 nm ( $15\text{--}6\text{ Wcm}^{-2}$ ). Jede Markierung bestand aus drei DNA-Ankersträngen zum Anbinden von Alexa647-markierten DNA-Gegensträngen *via* DNA-Hybridisierung. Superaufgelöste Bilder wurde infolge sukzessiver Lokalisierung blinkender Farbstoffmoleküle mit unterschiedlichen Pufferzusammensetzungen rekonstruiert: (a-b) dSTORM 70 mM ME, (e-f) ROXS/dSTORM 14 mM ME, (i-j) COT/dSTORM 70 mM ME. (b, f, j) Querschnittshistogramme von ausgewählten supraaufgelösten Doppelspots. (c, g, k) Histogramme von Halbwertsbreite und (d, h, l) Photonenzahl pro Lokalisierung unter Verwendung von dSTORM, ROXS/dSTORM, COT/dSTORM. Die angegebenen Fehler sind die Standardabweichungen der Gauß-Fitfunktionen. Alle Messungen wurden unter Sauerstoffentzug durchgeführt. Der Maßstabsbalken entspricht 400 nm.

gestiegen ist (s. Abbildung 5.7 d, h, l). Die besten Ergebnisse für ROXS/dSTORM wurden mit 14 mM ME erhalten, obwohl ROXS in Kombination mit einer niedrigeren ME-Konzentration (z.B. 7 mM) mehr Photonen pro Anzustand liefern kann (s. Abbildung 5.1). Wie es in Kapitel 3.2.2 erwähnt wurde, ist lokalisierungsbasierte Superauflösungsmikroskopie auf die Akkumulation von Lokalisierungen in ausreichender Menge angewiesen.

Eine niedrigere ME-Konzentration von 7 mM verschlechtert jedoch die Qualität von superaufgelösten Bildern, da die Anzahl der Lokalisierungen pro Markierung abnimmt. Dies ist dadurch zu erklären, dass das Gesamtphotonenbudget von einzelnen Alexa647-Molekülen in Kombination von ROXS mit 7 mM ME innerhalb von wenigen Lokalisierungen aufgebraucht wird. Dieser Zusammenhang stellt im Allgemeinen die grundlegende Limitierung dieser Herangehensweise dar, die Photonenzahl bei dSTORM durch einen zusätzlichen Triplett-Quencher zu erhöhen.

Zusammenfassend schneidet ROXS als Triplett-Quencher ähnlich wie COT in Hinsicht auf die superaufgelösten Bilder ab. Der Vorteil der Kombination von ROXS mit dSTORM besteht jedoch darin, dass keine zusätzlichen organischen Lösemittel und eine geringere UV-Reaktivierungsleistung benötigt werden. Dies erscheint vor allem dann vorteilhaft, wenn sensible Proben (z.B. Proteinsysteme) untersucht werden.

## 5.2 Optimierung der photophysikalischen Eigenschaften von EYFP

Trotz zahlreicher Versuche, durch gezielte und zufällige Mutationen, die Eigenschaften von fluoreszierenden Proteinen (FP) zu optimieren, unterliegen FPs ihrem organischen Pendant in Punkten Stabilität gegenüber Photobleichen und Helligkeit. Es wurde auch nach Alternativwegen geschaut, die FP-Eigenschaften durch Veränderung der Umgebungsbedingungen zu optimieren. Es sind leider nur wenige Beispiele bekannt, durch externe Stimuli die FP-Eigenschaften positiv zu beeinflussen [105, 106, 107]. Um Experimente solcher Art im Rahmen dieser Arbeit schnell, flexibel und im großen Maßstab zu gestalten, wurden immobilisierte EYFPs (enhanced yellow fluorescent proteins) *in vitro* unter unterschiedlichen chemischen Bedingungen untersucht. Da die Fähigkeit zur Fluoreszenz von FPs nicht an bestimmte intrazelluläre Kofaktoren gebunden ist, stellen die Untersuchungen *in vitro* eine legitime Alternative dar [42]. Die kontrollierte Immobilisierung von EYFP erfolgte über die spezifische DNA-Hybridisierung an die DNA-Origami-Nanostrukturen, die als molekulares Steckbrett benutzt wurden. Dafür wurden EYFP-DNA-Konjugate unter Verwendung eines bispezifischen Vernetzungsgradienten Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclo-hexan-1-carboxylat (sSMCC) hergestellt. Des Weiteren lag das Augenmerk der photophysikalischen Untersuchungen darauf, die Kompatibilität von EYFP mit den Messbedingungen der dSTORM-Superauflösungsmikroskopie, die für organische Farbstoffe etabliert wurde (s.o.), zu untersuchen [108].

### 5.2.1 Herstellung von EYFP-DNA-Konjugaten

Das aufgereinigte EYFP-Protein (s. Abbildung 5.8), das zwei Modifikationen in Form eines 6xHis-Tags und einer thiolhaltigen Cystein-Aminosäure (Cys) am C-Terminus enthielt, wurde mit einem Amino-modifizierten DNA-Strang (DNA-NH<sub>2</sub>) über einen sSMCC-Linker in einer Zwei-Schritt-Reaktion gekoppelt [97, 99, 108] (s. Abbildung 5.9). Der sSMCC-Linker trägt zwei spezifische chemische Gruppen: NHS-Ester und Maleimid. Jeder dieser Reaktionsschritte wurden chromatographisch aufgereinigt (Abbildungen 5.10 b, 5.11 a und 9.6). Im Vorfeld wurden die Edukte der Kopplungsreaktion (z.B. freies DNA-NH<sub>2</sub>, sSMCC) chromatographisch untersucht, um die erhaltenen Chromatogramme aus den jeweiligen Konjugationsschritten besser interpretieren zu können (s. Abbildung 5.10 a, c). Da zwischen dem freien DNA-NH<sub>2</sub> und dem aktivierten DNA-NH-Maleimid chromatographisch kaum Unterschied bestand (s. Abbildung 5.10 b-c), wurde ein 100-

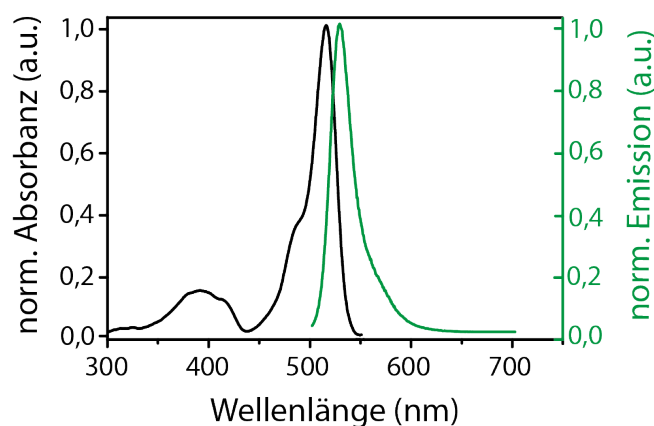


Abbildung 5.8: Absorptions- und Emissionsspektren von aufgereinigtem EYFP in Tris-Puffer (ca. 15  $\mu\text{M}$ ) mit entsprechenden Maxima bei 514 nm und 527 nm. Das Absorptionsnebenmaximum im UV-Bereich (bei 400 nm) entspricht der protonierten Form des EYFP-Chromophors.

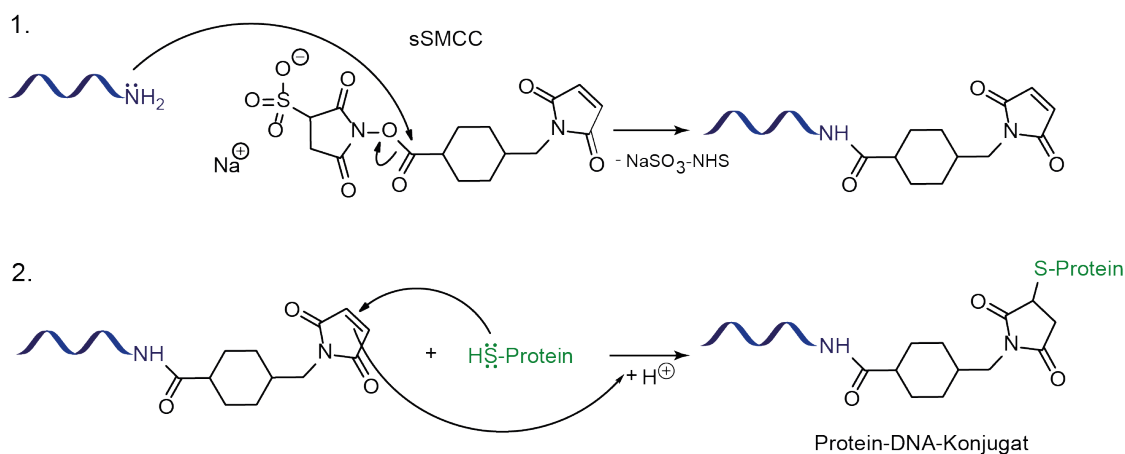


Abbildung 5.9: Zwei-Schritt-Reaktion für die sSMCC-vermittelte Kopplung eines aminomodifizierten DNA-Strangs (DNA-NH<sub>2</sub>) mit einer thiolhaltigen Cysteingruppe von EYFP. Im ersten Schritt greift die nukleophile Amin-Gruppe der DNA den NHS-Ester von sSMCC unter Bildung eines Amids an. Im zweiten Schritt greift die Thiolgruppe von EYFP nukleophil den Kohlenstoff der Doppelbindung der Maleimidgruppe an.

facher Überschuss von sSMCC verwendet. Auf diese Weise wurde der Reaktionsverlauf zugunsten der aktivierten DNA gefördert. Die Auftrennung der Reaktionsprodukte des letzten Kopplungsschrittes (s. Abbildung 5.9) erfolgte nach der Ladung mittels Anionenaustauschchromatographie (s. Abbildung 5.11 a), wobei Peak II als EYFP-DNA-Konjugat identifiziert wurde. Zum einen lag dies im gleichzeitigen Erscheinen von erhöhter Absorption bei drei spezifischen Wellenlängen sowie in der quantitativen Abfolge der Absorbanzwerte: 260 nm > 280 nm > 514 nm begründet. DNA alleine absorbiert kaum bei 514 nm,

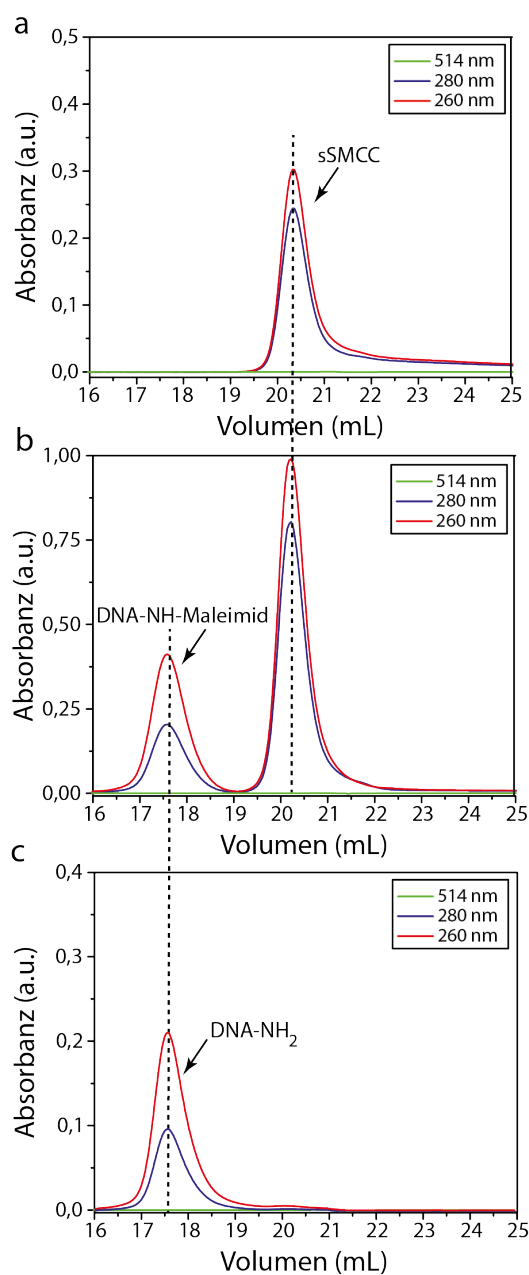


Abbildung 5.10: Superdex-Gelfiltrationschromatographie von (a) freiem sSMCC-Linker (b) erstem Kopplungsschrittes in Abbildung 5.9 DNA mit sSMCC und (c) von freiem DNA-Strang unter Beobachtung der Absorbanz bei 260 nm, 280 nm, 514 nm.

sondern nur EYFP. Da DNA den höchsten 260 nm-Extinktionskoeffizienten im Vergleich zu anderen Wellenlängen und EYFP hat, muss der Peak des EYFP-DNA-Konjugats auch den höchsten Absorbanzwert bei 260 nm im Anionenaustauschchromatogramm aufweisen (s. Kapitel 4.1.2). Zum anderen ist das relative hohe Elutionsvolumen und die damit verbundene hohe NaCl-Konzentration ein starker Hinweis auf die Anwesenheit der negativ

geladenen DNA in Peak II. Aus den oben genannten Gründen handelt es sich bei den Peaks I und III jeweils um freies EYFP und DNA. Anschließend wurde Peak II durch die native und denaturierende PAGE-Elektrophorese untersucht (s. Abbildungen 5.11 b-c).

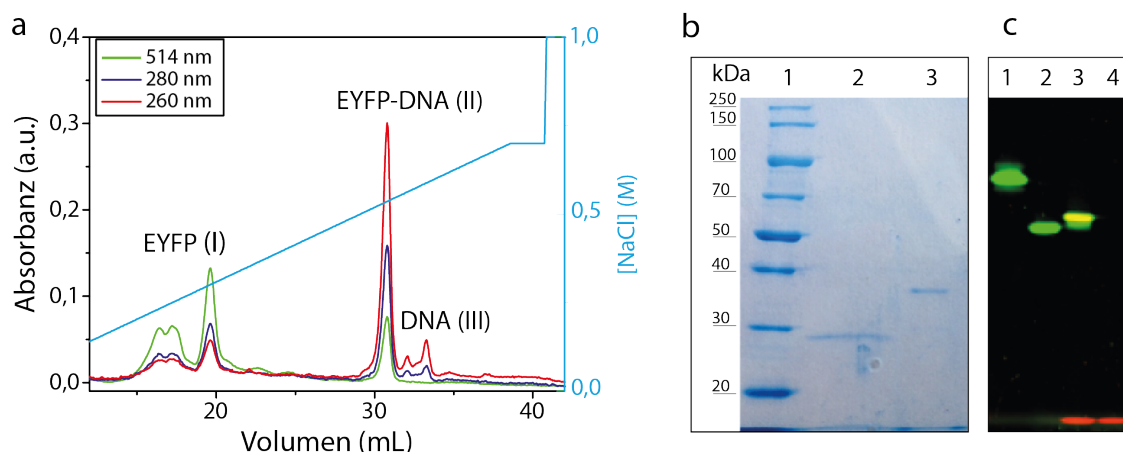


Abbildung 5.11: (a) Aufreinigung von EYFP-DNA mittels der MonoQ-Anionenaustauschchromatographie unter Beobachtung der Absorbanz bei 260 nm, 280 nm, 514 nm und des NaCl-Gradienten. (b) Denaturierendes 15 % SDS-PAGE-Gel mit Proteinleiter (1), aufgereinigtem EYFP-Protein (28 kDa, Bande 2) und Peak II aus (a) (35 kDa, Bande 3). Visualisierung der Banden erfolgte durch Coomassie. (c) 15 % natives PAGE-Gel von aufgereinigtem EYFP-Protein (Bande 1), von Peak II aus (a) (Bande 2), Peak II aus (a) hybridisiert mit einem Atto655-markiertem Gegenstrang (Bande 3) und von Atto655-markiertem Gegenstrang (Bande 4). Visualisierung der Banden erfolgte durch die Fluoreszenzanregung mit 473 nm (grün) und 635 nm (rot) mit Hilfe eines Fluoreszenzscanners. Gelb steht für die Kolokalisation des Fluoreszenzsignals infolge der Anregung mit 473 nm und 635 nm.

Die Analyse mittels der denaturierenden SDS-PAGE-Gelelektrophorese liefert Aussagen über die molekulare Masse und somit über die Stöchiometrie der Konjugation. Da die molekulare Masse von EYFP ca. 29,7 kDa (Bande 2, Abbildung 5.11 b) und die des EYFP-DNA-Konjugats ca. 34,7 kDa (Bande 3, Abbildung 5.11 b) beträgt, handelt es sich beim Peak II um das EYFP-DNA-Konjugat mit einer 1:1-Stöchiometrie. Das native PAGE-Gel unter Fluoreszenzanregung ist in Abbildung 5.11 c dargestellt. Im Vergleich zu freiem EYFP (Bande 1, Abbildung 5.11 c) weist Peak II eine erhöhte Mobilität auf (Bande 2, Abbildung 5.11 c), die auf das Vorhandensein der negativ geladenen DNA zurückzuführen ist. Des Weiteren wurde Peak II (grün) mit einem Atto655-markierten Gegenstrang (rot) hybridisiert. Die Kolokalisation der beiden Fluoreszenzsignale (gelb) liefert einen zusätzlichen Nachweis für die erfolgreiche Synthese vom EYFP-DNA-Konjugat unter Erhalt der Fluoreszenzfähigkeit von EYFP.



### 5.2.2 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von photophysikalischen EYFP-Eigenschaften

Für die photophysikalischen Untersuchungen von EYFP unter Benutzung eines TIRF-Mikroskops wurden DNA-Origami-Nanostrukturen als molekulares Steckbrett eingesetzt, die zu 12-Helixbündeln ( $220 \times 14 \times 14 \text{ nm}^3$ , 12HB) gefaltet wurden (s. Abbildung 5.12 a). Jede 12HB-DNA-Origami-Struktur verfügt über einen DNA-Ankerstrang zum externen Anbinden von EYFP-DNA-Konjugaten *via* DNA-Hybridisierung. Des Weiteren wurden DNA-Origami-Strukturen zusätzlich mit einem spektral unterschiedlichen organischen Fluoreszenzfarbstoff Atto647N sowie mit vier weiteren Biotin-Molekülen ausgestattet, die schon beim Falten in die DNA-Origami-Strukturen eingebaut wurden. Über die Koloka-

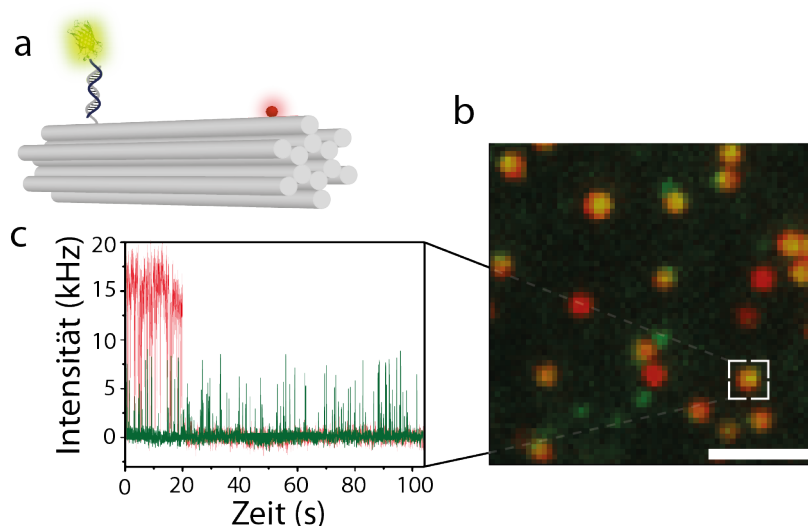


Abbildung 5.12: (a) Skizze eines 12-Helixbündel-DNA-Origamis (12HB), das extern mit einem EYFP-DNA-Konjugat über einen DNA-Ankerstrang sowie intern mit einem Atto647N-Farbstoffmolekül fluoreszenzmarkiert ist. (b) Bispektrales TIRF-Bild vom Konstrukt in (a) entstand durch Überlagerung von zwei Farbkanälen infolge sequentieller Anregung mit 644 nm und 488 nm: grün steht für EYFP und rot für Atto647N. Gelb steht für Kolo-kalisation der beiden Markierungen im dargestellten Falschfarbenbild, Maßstabbalken  $2 \mu\text{m}$ . (c) Repräsentative Fluoreszenzspur eines kolo-kalisiertes EYFP-Atto647N-Paares gemessen im dSTORM-Puffer. Die Kolo-kalisationsausbeute betrug insgesamt ca. 65 %, wobei die roten Spots als Bezugsgröße betrachtet wurden.

lisation mit Atto647N-Farbstoffmolekülen wurden die EYFP-Moleküle eindeutig identifiziert. Das war notwendig, weil einzelne EYFPs aufgrund ihrer geringen Helligkeit auf Einzelmolekülniveau von vorhandenen Verunreinigungen im blauen Anregungsbereich schlecht zu unterscheiden waren. In Abbildung 5.12 b ist ein TIRF-Bild der mit EYFP und Atto647N markierten 12HB-DNA-Origami-Strukturen dargestellt, das durch

Überlagerung zweier Farbkanäle (grün für EYFP und rot für Atto647N) entstand. Das Fluoreszenz-Zeit-Signal wurde aus den gelben Spots extrahiert (s. Abbildung 5.12 c), wobei nur das von EYFP weiter zur Kinetikanalyse herangezogen wurde. Diese gelben Spots repräsentieren Kollokalisierung von EYFP mit Atto647N auf ein und derselben 12HB-DNA-Origami-Struktur.

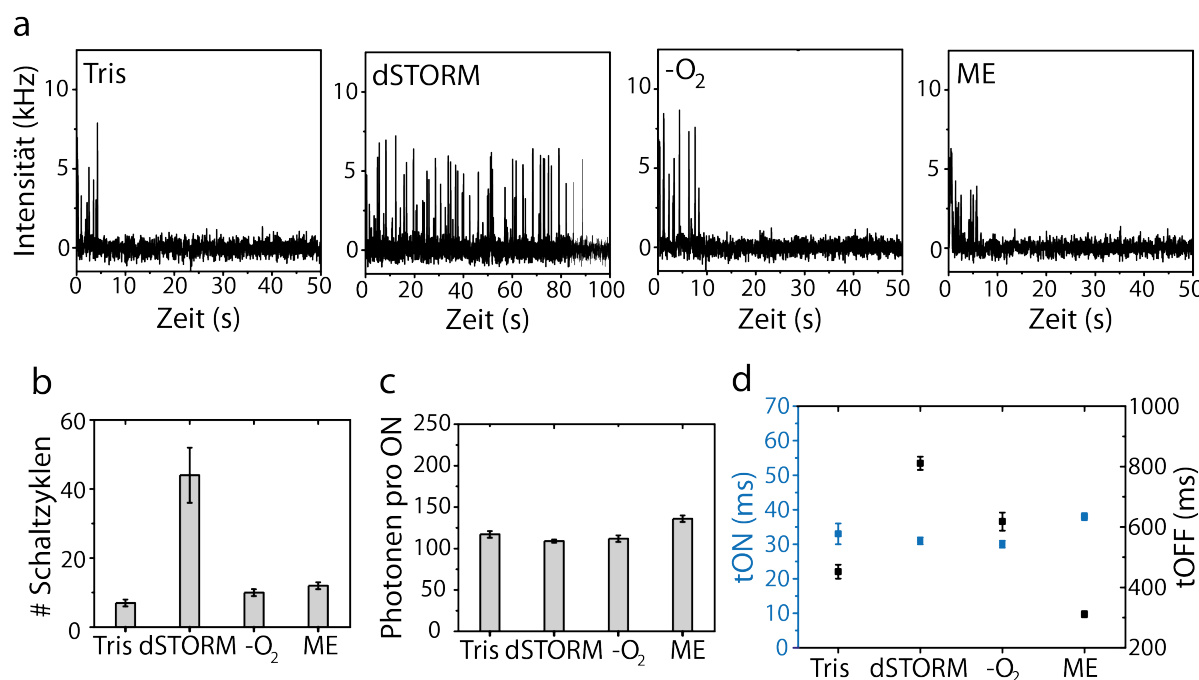


Abbildung 5.13: Analyse von photophysikalischen Eigenschaften von EYFP immobilisiert auf 12-Helixbündel-DNA-Origamis (s. Abbildung 5.12 a). (a) Repräsentative Einzelmolekül-Fluoreszenzspuren von EYFP unter den angegebenen Pufferzusammensetzungen: Tris-Puffer, enzymatischer Sauerstoffentzug ( $-O_2$ ), 70 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol (ME) sowie deren Kombination (dSTORM). (b) Mittlere Anzahl von Schaltzyklen bzw. Anzuständen vor dem Eintreten von langlebigen Dunkelzuständen bzw. Photobleichen. (c) Mittlere Photonenzahl pro Anzustand. (d) Mittlere Dauer von An- und Auszuständen ( $t_{ON}$ ,  $t_{OFF}$ ). Die Messungen wurden unter kontinuierlicher 488 nm-Laserbeleuchtung (ca.  $800 \text{ Wcm}^{-2}$ ) und mit einer Integrationszeit von 30 ms durchgeführt. Dargestellte Fehlerbalken sind Fitfehler aus exponentiellen Anpassungen von Histogrammen der dargestellten Kinetikdaten, die jeweils von über 100 einzelnen Farbstoffmolekülen stammen.

Es wurden vier chemische Bedingungen im Hinblick auf die Kompatibilität mit dSTORM untersucht: (1) Tris-Puffer ohne Zusätze, (2) dSTORM (70 mM ME mit Sauerstoffentzug) und nur unter (3) enzymatischem Sauerstoffentzug sowie (4) Zugabe von ME (70 mM) (s. Abbildung 5.13). Wie erwartet weisen einzelne EYFP-Moleküle im Tris-Puffer ohne chemische Zusätze ein intrinsisches Blinkverhalten im ms-Bereich ( $t_{ON} = 30 \text{ ms}$ ,

tOFF = 500 ms) auf (s. Kapitel 3.2.2.2), wobei nach nur ca. 5 s EYFP in einen reversiblen langlebigen bzw. irreversiblen Dunkelzustand (Photobleichen) übergeht. Wie es für FPs im Allgemeinen zu erwarten ist, sind die Photonenzahlen pro Anzustand relativ gering und befinden sich im unteren dreistelligen Bereich (s. Abbildung 5.13 a, c). Erstaunlicherweise wird die Photostabilität von EYFP unter dSTORM-Bedingungen drastisch erhöht, sodass das Photobleichen erst nach ca. 100 s eintritt (s. Abbildungen 5.12 c, 5.13 a). Dieser Effekt kann durch die mittlere Anzahl der Schaltzyklen quantitativ beschrieben werden, die die einzelnen EYFPs im Schnitt vorm Eintreten von Photobleichen bzw. langem Dunkelzustand aufweisen (s. Abbildung 5.13 b). Verglichen mit Tris-Puffer führt die dSTORM-Pufferzusammensetzung zu einer beachtlichen 5-fachen Erhöhung der Schaltzyklenzahl. Eine hohe Photostabilität von Fluoreszenzfarbstoffen resultiert in einer hohen Anzahl an Lokalisierungen, was einen beträchtlichen Einfluss auf die Qualität von superaufgelösten Bildern hat (s. Kapitel 3.2.2). Die Kinetikdaten wie die mittlere Dauer der Anzustände (tON) sowie deren mittlere Photonenzahl blieben unter dSTORM weitgehend unverändert im Vergleich zu anderen Pufferzusammensetzungen. Die mittlere Dauer der Auszustände (tOFF) nahm dagegen leicht zu, was als positiver Einfluss im Hinblick auf das tON/tOFF-Verhältnis für LB-Superauflösungsmikroskopie (s. Kapitel 3.2.2) zu verbuchen ist. Ferner haben die chemischen Bedingungen (3 - 4) weder auf die Photostabilität noch auf die Kinetikeigenschaften einzelner EYFP-Moleküle einen signifikanten Einfluss (s. Abbildung 5.13). Somit wurde eindeutig gezeigt, dass Sauerstoffentzug und die Zugabe von ME nur in Kombination (dSTORM) als Umgebungsbedingungen einen positiven Einfluss auf die photophysikalischen Eigenschaften von EYFP haben.

### 5.2.3 Charakterisierung von EYFP-Superauflösungsteststrukturen

Um die erzielten Ergebnisse auf die lokalisierungsbasierte Superauflösungsmikroskopie zu übertragen, wurden die verwendeten 12-Helixbündel-DNA-Origami-Strukturen zu Superauflösungsreferenz- bzw. Testproben umfunktionalisiert (s. Abbildung 5.14 a). Dies geschah, indem 12HB-DNA-Origami-Strukturen mit zwei Markierungen in einem Abstand von 100 nm und 160 nm ausgestattet wurden. Für die beiden Abstände bestand eine der Markierungen aus 18 DNA-Ankersträngen und die andere aus 16 bzw. 18 Ankersträngen für jeweils 100 nm bzw. 160 nm. Zunächst wurden die hergestellten und mit EYFP markierten 12HB-DNA-Testproben durch Rasterkraftmikroskopie (AFM, engl. atom force microscopy) sowie durch die Wechselwirkung mit den für EYFP sehr spezifischen Nanoantikörpern (engl. nanobodies, Nb) quantitativ charakterisiert.

In Abbildung 5.14 b-c sind AFM-Aufnahmen von 12HB-DNA-Nanometerlinealen (160 nm-Abstand) mit und ohne hybridisierte EYFP-DNA-Konjugate auf Micaoberflächen dargestellt [99, 108]. Das AFM-Bild in Abbildung 5.14 c weist wohlgeformte hantelförmige Nanostrukturen auf, was auf eine erfolgreiche Herstellung von EYFP-12HB-DNA-Teststrukturen bzw. Nanometerlinealen zurückzuführen ist. Auffällig sind jedoch ein erhöhtes Hintergrundrauschen sowie eine geringe Konzentration von diesen EYFP-Nanometerlinealen. Beides ist darauf zurückzuführen, dass durch den Aufreinigungsschritt unter Benutzung von Amicon-Filtern große Verluste von EYFP-12HB-Strukturen infolge unspezifischer Wechselwirkung zwischen EYFP-markierten DNA-Origami-Strukturen und dem Filtermaterial beobachtet wurden. Diese Verluste konnten unter vorheriger Absättigung der Amicon-Filter mit BSA-Proteinen zumindest teilweise verhindert werden. Der Einsatz von BSA führte jedoch zu diesem verrauschten Hintergrund in den AFM-Bildern.

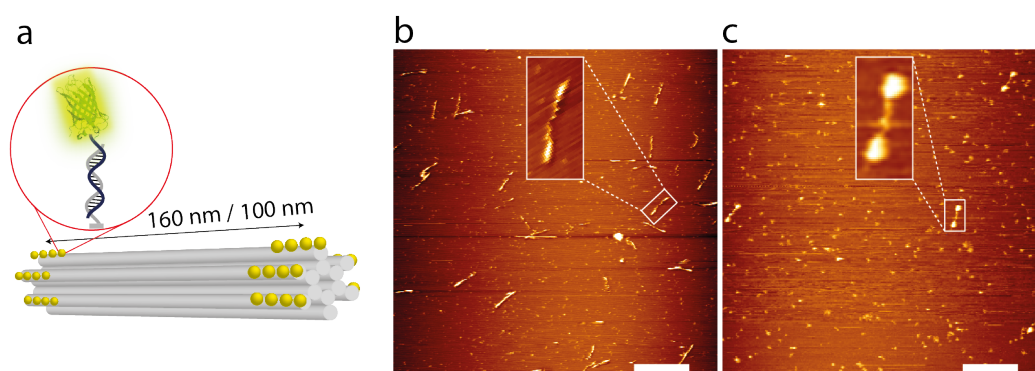


Abbildung 5.14: (a) Skizze einer 12-Helixbündel-DNA-Origami-Struktur für die Superauflösungsmikroskopie, die zwei Markierungen bestehend jeweils aus 16 bis 19 DNA-Ankersträngen im Abstand von 100 nm und 160 nm für die Anbindung von EYFP-DNA-Konjugaten trägt. Entsprechende AFM-Bilder von 12HB-DNA-Strukturen ohne (b) und mit EYFP-Markierungen (c). Einzelne Spots auf der Micaoberfläche in (c) sind auf BSA-Proteine zurückzuführen. Maßstab-balken 500 nm.

Im nächsten Schritt wurde die Wechselwirkung von EYFP als Antigen mit antiEYFP-Nanoantikörpern auf Einzelmolekülniveau nachgewiesen. Ein Nanoantikörper wird auch als Einzeldomänenantikörper bezeichnet und ist eine Miniaturform von konventionellen Y-förmigen Antikörpern. Er besteht im einfachsten Fall aus einem einzigen antigenerkennenden variablen Fragment (VHH) der Schwere-Ketten-Antikörper, die von spezifischen Tieren wie Kamelen produziert werden [109]. Diese Wechselwirkung von klassischen Antikörpern sowie Nanobodies mit dem Antigen (z.B. EYFP) unterliegt dem sogenannten Schlüssel-Schloss-Prinzip und ist auf die strukturelle und biochemische Intaktheit beider

Wechselwirkungspartner angewiesen.

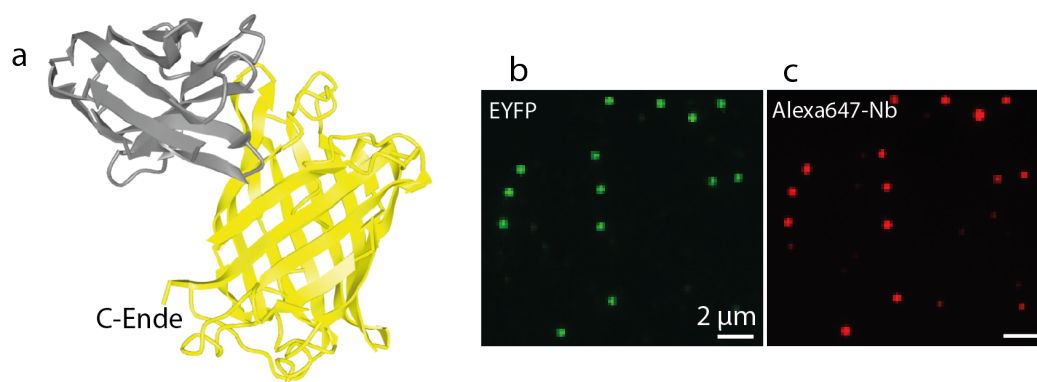


Abbildung 5.15: (a) Struktur von EYFP-Nanoantikörper-Komplex [109]. Der Nanoantikörper (Nb) wechselwirkt in dem Bereich von EYFP, der dem für die Konjugation mit DNA verwendeten C-Ende gegenüberliegt. (b-c) TIRF-Bilder von zwei Farbkanälen infolge simultaner Fluoreszenzanregung von EYFP-Molekülen (b) und von mit Alexa647 markierten antiEYFP-Nanoantikörpern (c). Dafür wurden die mit EYFP-DNA-Konjugaten ausgestatteten 12HB-DNA-Origami-Testproben (160 nm-Abstand, s. Abbildung 5.14) in einer passivierten Flusskammer immobilisiert und in Kontakt mit einer Lösung von antiEYFP-Nanoantikörpern (1 nM) gebracht.

Der eingesetzte antiEYFP-Nanoantikörper wechselwirkt frontal mit den  $\beta$ -Faltblättern in dem Bereich vom EYFP, der dem C-Ende entgegengesetzt ist [109] (s. Abbildung 5.15 a). Für die Visualisierung der Wechselwirkung wurden Nanobodies mit Alexa647-Farbstoffmolekülen über NHS-Chemie markiert. Im Schnitt trug jeder Nanoantikörper zwei Alexa647-Farbstoffmoleküle. Da der  $K_d$ -Wert des FP-Nanobody-Komplexes ca. 0,59 nM beträgt [109], wird diese Wechselwirkung als Binde- und Abbindeereignisse im ms-Bereich auf Einzelmolekülniveau wahrgenommen [110]. Daher wurden die in einer passivierten Flusskammer immobilisierten EYFP-12HB-DNA-Origami-Strukturen (160 nm) einer nM-Lösung rot-fluoreszenzmarkierter Nanoantikörper ausgesetzt und unter TIRF-Bedingungen mit gleichzeitiger Anregung von EYFP und Alexa647 mikroskopisch aufgenommen. Um das Fluoreszenzsignal der an- und abbindenden Nanoantikörper zu akkumulieren, wurden 50 aufeinanderfolgende Videoframes aufsummiert. Die daraus resultierenden bispektralen TIRF-Bilder (grün EYFP, rot Alexa647-Nanoantikörper) sind in Abbildung 5.15 b-c dargestellt. Die Wechselwirkung mit den Nanoantikörpern ist in der Summe so spezifisch, so dass eine beinahe 100 %-ige Koloalisationsausbeute zu verzeichnen ist.

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass EYFPs in dicht markierten EYFP-12HB-Teststrukturen ihre strukturelle und biochemische Intaktheit erhielten, was sich

durch deren Fluoreszenzaktivität und spezifische Wechselwirkung mit antiEYFP-Nanoantikörpern äußert.

#### 5.2.4 Superauflösungsmikroskopie mit EYFP-DNA-Konjugaten

Im nächsten Schritt wurden lokalisierungsbasierte Superauflösungsmessungen von mit EYFP markierten 12HB-DNA-Testproben unter den vier oben erwähnten Pufferbedingungen durchgeführt. Bei diesen Messungen liegt der Schwerpunkt auf dem kürzeren Abstand (100 nm). Die Superauflösungsmessungen dienten gleichzeitig zur quantitativen Analyse der Teststrukturen. Es ist zu erwarten, superaufgelöste Doppelspots im Abstand von ca. 100 nm zu erhalten. Wie Abbildung 5.16 a zu entnehmen ist, sind die Doppelspots in Tris-Puffer nur schwer zu erkennen. Des Weiteren wurden häufiger Einzelspots anstatt von Doppelspots detektiert. Die schlechte Qualität der superaufgelösten Daten von EYFP in Tris-Puffer ist auf die geringere Anzahl der erhaltenen Lokalisierungen pro DNA-Origami zurückzuführen (s. Abbildung 5.16 d), was wiederum sehr gut mit den Ergebnissen aus der Untersuchung einzelner EYFP-Moleküle übereinstimmt. Ergänzend dazu wurde der Einfluss von UV-Reaktivierung und anschließender Anregung mit 488 nm in Tris-Puffer untersucht, was sich in der Analyse der Kinetikdaten einzelner EYFP-Moleküle aufgrund der Notwendigkeit der alternierenden Anregung und Reaktivierung als unpraktisch und fehleranfällig erwies. Durch den Einsatz von UV-Reaktivierung (s. Abbildung 9.7) konnte die Anzahl der Lokalisierungen sogar verdoppelt werden. Das Auftreten von Einzelspots konnte jedoch nicht gänzlich vermieden werden. Die Messungen unter dSTORM-Bedingungen (s. Abbildung 5.16 i, u) lieferten eine beeindruckende 5-fache Erhöhung der Lokalisierungen pro DNA-Origami-Struktur im Vergleich zu Tris-Puffer, was sich in den superaufgelösten hochqualitativen und robusten Doppelspot-Strukturen widerspiegelt. Dieses Ergebnis steht sehr gut in Übereinstimmung mit der erhaltenen Anzahl der Schaltzyklen aus Abbildung 5.13 b. Des Weiteren sind die erhaltenen superaufgelösten Bilder unter dem enzymatischen Sauerstoffentzug sowie unter Zugabe von ME (Abbildung 5.16 m, q) von geringer Qualität durch die unzureichende Stabilität gegenüber Photobleichen. Die gemessenen Abstände von  $94 \pm 6$  nm (Tris),  $95 \pm 6$  nm (Tris/UV),  $95 \pm 5$  nm sowie  $154 \pm 6$  nm (dSTORM),  $94 \pm 5$  nm (Sauerstoffentzug) und  $95 \pm 6$  nm (ME-Zugabe) zwischen den Markierungen innerhalb einzelner EYFP-12HB-Origami-Strukturen unter vier Bedingungen stehen in guter Übereinstimmung mit den theoretischen Werten von 100 nm bzw. 160 nm. Die gemessenen Abweichungen von wenigen Nanometern kommen in den meisten Fällen durch die mögliche Flexibilität und Salzkonzentrationsabhängigkeit

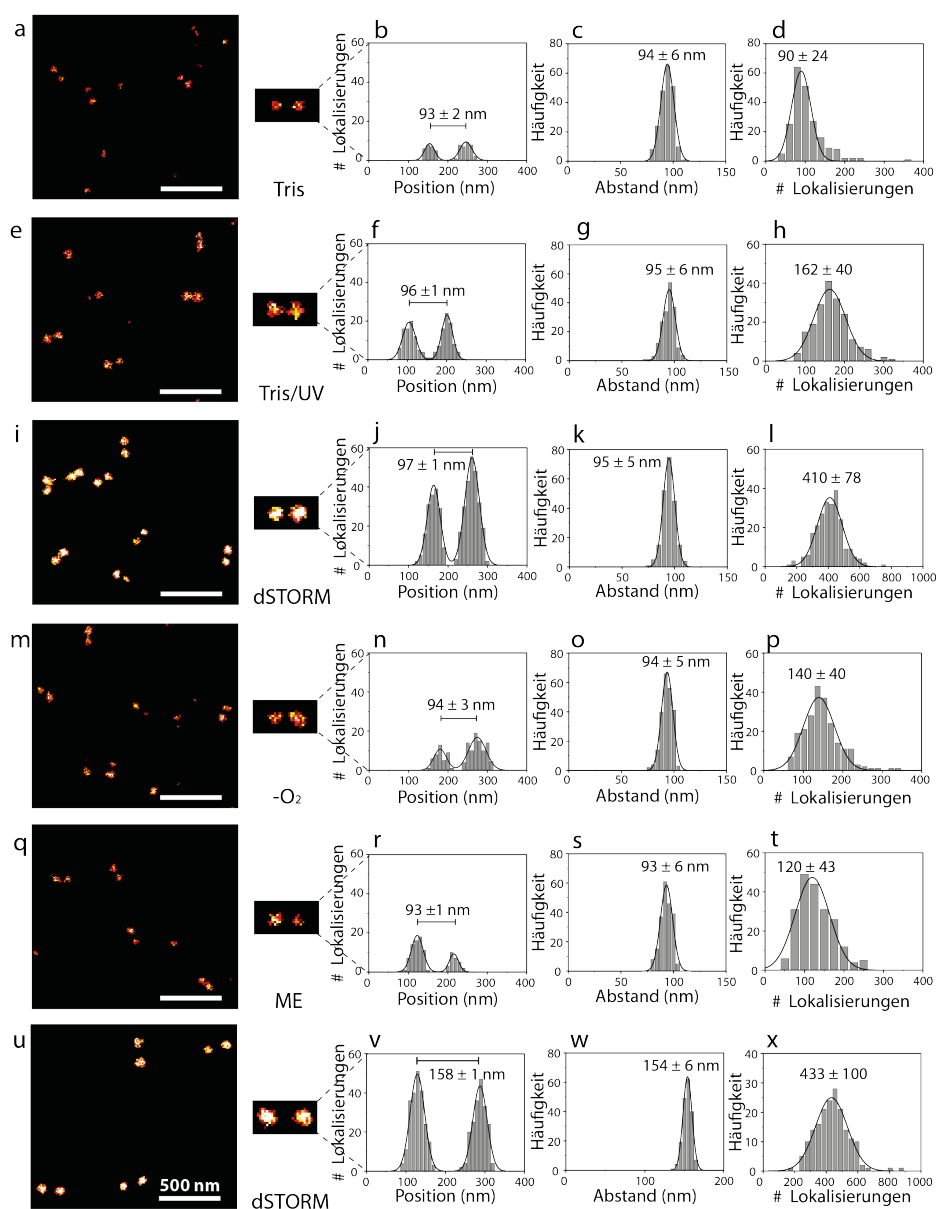


Abbildung 5.16: LB-Superauflösungsmikroskopie von 12HB-DNA-Origami-Strukturen markiert mit EYFP-DNA in einem Abstand von 100 nm (a-t) und 160 nm (u-x): Tris (a-h), dSTORM (i-l, u-x), Sauerstoffentzug (m-p) und ME (q-t). Die Messungen wurden unter kontinuierlicher Beleuchtung mit einem 488 nm-Anregungslaser (ca.  $800 \text{ Wcm}^{-2}$ ) (a-d, i-x) sowie unter alternierender 488 nm-Anregung und 405 nm-Reaktivierung ( $500 \text{ Wcm}^{-2}$ ) (e-h) ausgeführt. Superaufgelöste Bilder (a, e, i, m, q, u), Querschnittshistogramme (b, f, j, n, r, v). Einzelne Doppelpots wurden durch die ermittelten Abstände und die Anzahl der Lokalisierungen charakterisiert: (c, g, k, o, s, w und d, h, l, p, t, x). Im Schnitt mehr als 200 Strukturen wurden für jede Mess- und Pufferbedingung analysiert. Angegebene Fehler sind Standardabweichungen von Gauß-Fitfunktionen.

der Geometrie von DNA-Origami-Strukturen erklärt werden [84].

Nachdem die dSTORM-Methode als kompatibel mit EYFP nachgewiesen wurde, wurden im nächsten Schritt 2-Farben-Superauflösungsmessungen in Kombination mit Alexa647 durchgeführt. Dafür wurden die benutzten EYFP-Teststrukturen mit zusätzlichen 20 An-

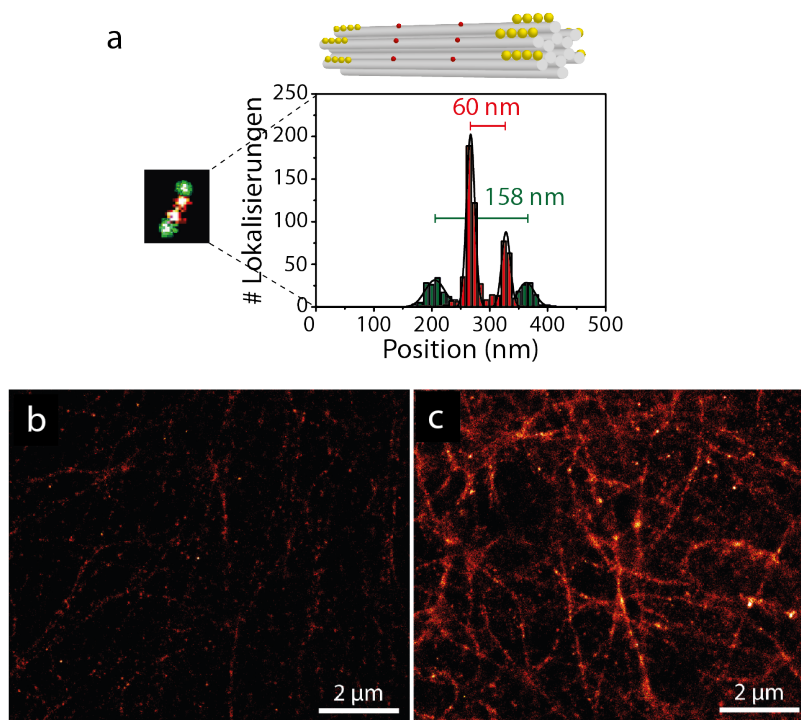


Abbildung 5.17: (a) 2-Farben-Superauflösungsmikroskopie von 12-Helixbündel-DNA-Origami-Strukturen, die mit zwei spektral unterschiedlichen Markierungen ausgestattet sind. Eine Markierung besteht aus insgesamt 36 DNA-Ankersträngen für Hybridisierung mit EYFP-DNA-Konjugaten im Abstand von 160 nm an äußeren Enden von 12HB. Zweite Markierung besteht aus insgesamt 20 DNA-Ankersträngen für Alexa647-DNA im Abstand von ca. 60 nm im mittleren Bereich von 12HB. Superaufgelöste Bilder von Mikrotubuli nach Überexpression von EYFP-Tubulin-Fusionsproteinen in fixierten *Vero*-Säugerzellen in (b) Tris-Puffer und unter (c) dSTORM.

kersträngen zum externen Anbinden von Alexa647-DNA ergänzt, die einen Abstand von ca. 60 nm bilden (s. Abbildung 5.17 a). Um nun den beobachteten stabilisierenden Effekt von dSTORM auf EYFP in der mikroskopischen Bildgebung von Zellen zu verifizieren, wurden Superauflösungsmessungen von Mikrotubuli durch Überexpression von EYFP-Tubulin-Fusionsproteinen in *Vero*-Säugerzellen<sup>3</sup> durchgeführt [108]. Wie Abbildung 5.17 b-c zu entnehmen ist, konnte eine erhöhte Photostabilität unter dSTORM-Bedingungen

<sup>3</sup>Die *Vero*-Zellen wurden von Dr. Birka Lalkens zur Verfügung gestellt.



auch in Zellen nachgewiesen werden. Die Aufnahme- und Darstellungsparameter der supraaufgelösten Bilder in Abbildung 5.17 b-c waren identisch, um die Vergleichbarkeit der Bilder untereinander zu gewährleisten. Das supraaufgelöste Bild von fixierten *Vero*-Säugerzellen unter dSTORM-Bedingungen lieferte aufgrund höherer Lokalisierungszahlen mehr strukturelle Zellinformationen im Vergleich zu Messungen im Tris-Puffer.

Das Fluorophor von FPs befindet sich im Inneren des Proteins. Somit liegt es etwas abgeschirmt von der Umgebung vor und steht unter starkem Einfluss der umliegenden Aminosäuren. Aus diesen Gründen kann die photophysikalische Wirkungsweise von ME unter Sauerstoffentzug (dSTORM) auf organische Farbstoffe (s. Kapitel 3.1.5.1, 3.2.2.1) nicht direkt auf FPs übertragen werden. Des Weiteren kann auch aufgrund dieser Komplexität der Wirkungsmechanismus von dSTORM, beruhend auf den erhaltenen Ergebnissen, nicht mit einer vollkommenen Sicherheit aufgeklärt werden. Es scheint, als ob dSTORM den Übergang von EYFP in den langlebigen, UV-reaktivierbaren Dunkelzustand verhindert. Die Lokalisierungszahl pro EYFP-DNA-Struktur konnte jedoch trotz der UV-Reaktivierungsversuche nicht deutlich erhöht werden. Somit kann der Übergang in den langlebigen Dunkelzustand ein erhöhtes Risiko des Photobleichens mit sich bringen. Unter dSTORM dagegen wird ein ununterbrochenes Fluoreszenzblinken von EYFP

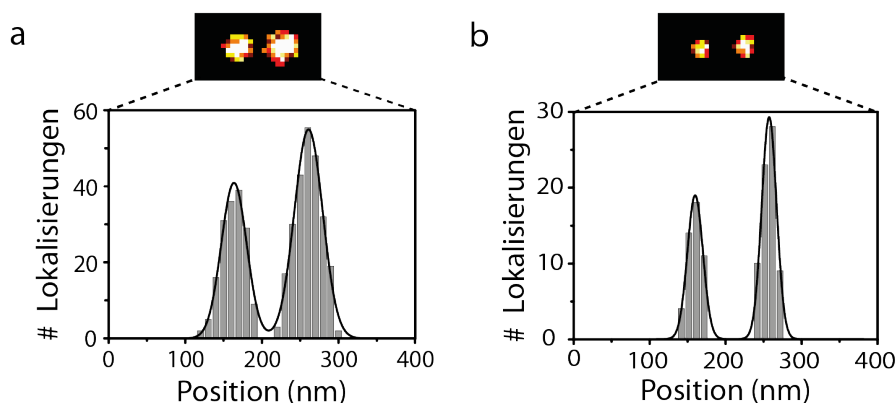


Abbildung 5.18: Verbesserung der Lokalisierungsgenauigkeit von EYFP unter dSTORM-Bedingungen von ca. 42 nm (a) zu 24 nm (b) aufgrund eines höheren Photonenzahl-Schwellenwerts, der zur Erkennung einer Lokalisierung eingesetzt wird.

im ms-Bereich über einen Zeitraum von bis zu 100 s beobachtet. Ferner bietet eine erhöhte Anzahl von Lokalisierungen mehr Handlungsfreiheit in der Datenauswertung. Da die Photonenzahlen pro Schaltzyklus bzw. Lokalisierung statistisch variieren, kann beispielsweise ein höherer Kontrastwert als Photonenzahl-Schwellenwert zur Erkennung ei-

ner Lokalisierung eingesetzt werden. Auf diese Weise kann die Lokalisierungsgenauigkeit um ca. 40 % verbessert werden, ohne die mittlere Photonenzahl von einzelnen EYFPs zu verbessern (s. Abbildung 5.18). Des Weiteren kann der Einsatz von UV-Licht auf viele biologische Proben phototoxisch wirken (z.B. DNA-Schäden, Veränderung der Zellform) [111]. Alternierende Anregungs- und Reaktivierungszyklen werden häufiger bei Fluoreszenzfarbstoffen im kurzwelligen Anregungsbereich (488 nm) benutzt, da UV einen sehr hohen Fluoreszenzhintergrund herbeiführt. Diese Alternierung verkompliziert unnötig die Aufnahmebedingungen und verlängert die Aufnahmezeit. Diese Nachteile fallen unter Benutzung von dSTORM-Messbedingungen weg, da der Einsatz von UV-Licht überflüssig gemacht wird.

## 5.3 Rückführung von fluoreszenzmarkierten DNA-Origami-Strukturen

### 5.3.1 Vorstellung der Vorgehensweise

Dieser Teil der Arbeit [112] entstammt einer Kooperation zwischen der PTB Braunschweig und TU Braunschweig unter maßgeblicher Beteiligung von Mario Raab. Mein Beitrag bezog sich auf das Design und Herstellung der Proben sowie auf Superauflösungsmessungen und deren Analyse.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bis jetzt die DNA-Origami-Strukturen, die mit Fluoreszenzmarkierungen in einem definierten Abstand zueinander ausgestattet waren, als Referenz- bzw. Testproben in der Superauflösungsmikroskopie betrachtet. Für die qualitativen Vergleichsmessungen von DNA-Origami-Teststrukturen am selben Mikroskop sind seine optischen Charakteristika wie z.B. finale Pixelgröße zwar wichtig, spielen aber keine entscheidende Rolle, da diese Eigenschaften bei jeder Messung gleich blieben. Aus einer Normalverteilung der evaluierten Abstände einzelner superaufgelöster Strukturen wurde bis jetzt ein mittlerer Abstandswert ermittelt. Die Fehlerangaben beschränkten sich dabei auf die Angabe der Standardabweichung der Gauß-Fitfunktion (ca. 5-6 nm), die als Maß für die erreichte Präzision agiert. Der entscheidende Vorteil der Nutzung von solchen DNA-Origami-Strukturen besteht in dem hohen Maß an Reproduzierbarkeit der mittleren Abstände, die beispielsweise durch DNA-PAINT-Aufnahmen von Proben gleichen Designs, gefaltet zu unterschiedlichen Zeitpunkten, an unterschiedlichen Tagen an ein und demselben Mikroskop erhalten wurden (s. Abbildung 5.19 e).

Um nun einen quantitativen Vergleich zwischen den Messergebnissen an unterschiedlichen Mikroskopen ziehen zu können, erfordert es eine umfassende metrologische Analyse der Einflussfaktoren sowie der damit einhergehenden Messunsicherheiten. Dadurch können DNA-Origami-Teststrukturen bzw. Nanometerlineale zu einem Messstandard (Messnormal) auf der Längenskala erweitert werden. Metrologie ist eine Wissenschaft, die sich mit den Grundlagen des Messens, mit der Theorie der Messfehler sowie mit der Rückführung der Messergebnisse auf die SI-Einheiten beschäftigt. Weltweit gibt es zahlreiche Institute wie PTB (Physikalisch-Technische Bundesanstalt) und NIST (the National Institute of Standards and Technology) die sich mit solchen metrologischen Fragestellungen intensiv auseinandersetzen und über umfassende Expertise verfügen. Auf internationaler Ebene stellt dabei GUM (engl. guide to the expression of uncertainty in measurement) eine einheitliche Vorgehensweise zur Ermittlung von Messunsicherheiten dar, um weltweit

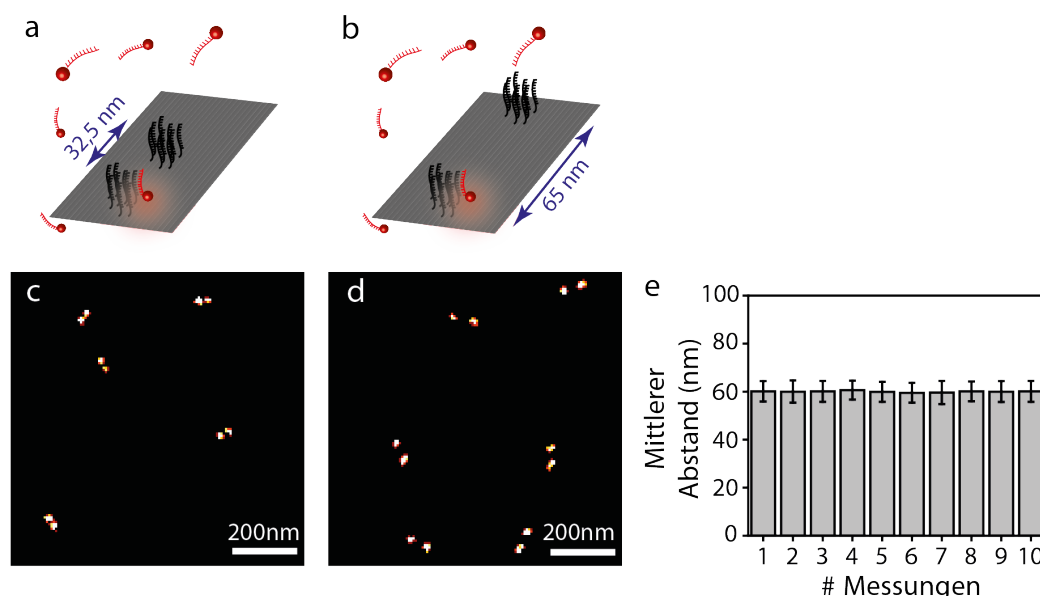


Abbildung 5.19: (a-b) Schematische Darstellung von rechteckigen DNA-Origami-Strukturen mit jeweils 9 DNA-Ankersträngen pro Fluoreszenzmarkierungen für DNA-PAINT-Superauflösungsmikroskopie, die einen theoretischen Abstand zwischen den Schwerpunkten von 65 nm bzw. 32,5 nm haben. (c-d) Die charakteristischen superaufgelösten Bilder der Proben in Form von Doppelspots, die durch Messungen am Mikroskop 1 unter 644 nm-Anregung ( $4 \text{ kW/cm}^2$ ) erhalten wurden. (e) Die dazugehörigen mittleren Abstände (65 nm-DNA-Origami-Struktur), die an unterschiedlichen Tagen (1-10) am Mikroskop 1 mit einer Pixelgröße von 101 nm gemessen und mit dem automatischen Abstandsbestimmungsalgorithmus (s. Gleichung 4.5) bestimmt wurden. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen der Gauß-Fitfunktionen.

eine Vergleichbarkeit der Messergebnisse zu gewährleisten. Laut GUM wird eine Modellgleichung aufgestellt, aus der ein mathematischer Zusammenhang zwischen der Messgröße und allen Einflussgrößen, die zur Messunsicherheit beitragen, hervorgeht. Das Gauß'sche Fortpflanzungsgesetz wird auf diese Modellgleichung angewandt, wobei die einzelnen Unsicherheitsbeiträge als Standardunsicherheit ( $u(k=1)$ ) in die Berechnung eingehen. Da Superauflösungsmikroskopie Abstände im Nanometerbereich auflöst, fallen entsprechende Messungen in den Bereich der Nanometrologie.

Im Rahmen dieses Projekts wurde die DNA-PAINT-Superauflösungsmethode benutzt, die eine der robustesten lokalisierungsbasierten Superauflösungstechniken darstellt [9]. Das Fluoreszenzblinking wurde durch diffundierende, kurze (6-8 Basen), Atto655-markierte DNA-Stränge generiert, welche an die DNA-Ankerstränge der DNA-Origami-Strukturen transient binden und abbinden (s. Abbildung 5.19 a-b). Der Vorteil der DNA-PAINT-Methode besteht darin, dass die Anzahl der Lokalisierungen pro Ankerstrang durch das Photobleichen des Farbstoffs kaum limitiert ist, da nach dem Abbinden ein neuer Atto655-

PAINT-Strang aus der Lösung an die Struktur bindet. Aus diesem Grunde kann beinahe das gesamte Photonenbudget (bis zu 50.000 Photonen) eines Farbstoffs auf eine einzige Lokalisierung aufgebraucht werden. Es wurden rechteckige DNA-Origami-Strukturen mit zwei Markierungen aus jeweils 9 DNA-Ankersträngen benutzt. Der theoretische Abstand zwischen den Schwerpunkten betrug 65 nm und 32,5 nm (s. Abbildung 5.19 a-b). Diese Proben wurden an drei unterschiedlichen TIRF-Mikroskopen gemessen, um die supraaufgelösten Bilder und Abstandsinformationen zu erlangen (s. Abbildung 5.19 c-e). Beim Mikroskop 1 und 2 handelt es sich um einen Eigenbau und beim Mikroskop 3 um ein kommerzielles Leica-GSD-Mikroskop (s. Kapitel 4.3).

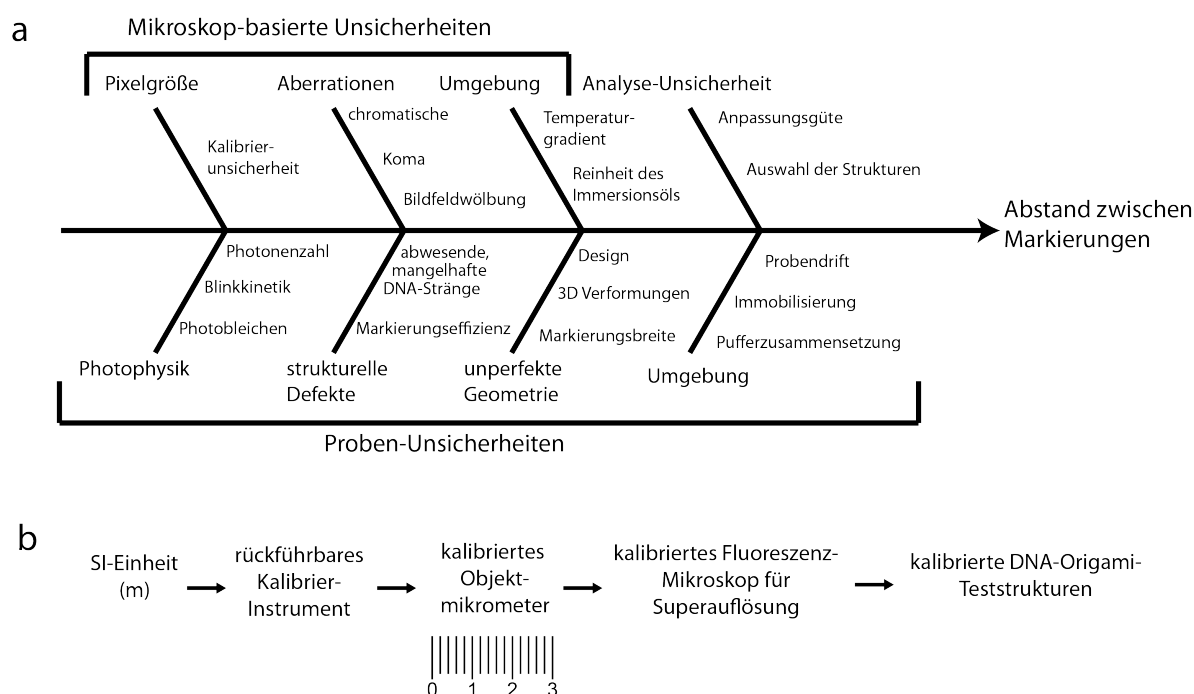


Abbildung 5.20: (a) Ishikawa-Diagramm zur Ermittlung von potentiellen Ursachen der Messunsicherheit unter Verwendung von DNA-Origami-Strukturen. (b) Ununterbrochene Messkette zur Rückführung von DNA-Origami-Teststrukturen auf die SI-Einheiten [112].

Im ersten Schritt der metrologischen Rückführung wird ein sogenanntes Ishikawa-Diagramm erstellt (s. Abbildung 5.20 a), das die wichtigsten Beiträge zur Messunsicherheit beinhaltet. Sie lassen sich in drei zentrale Kategorien unterteilen. Probenbezogene Messunsicherheiten betreffen z.B. die Blinkkinetik, Anzahl der Photonen pro Lokalisierung sowie strukturelle Heterogenität. Das Mikroskop trägt z.B. in Form von Pixelgröße, optischer Aberrationen zu Messunsicherheiten bei. Die Auswerteschritte wie z.B. Identifizie-

rung von DNA-Origami-Strukturen, Evaluierungsalgorithmus sowie Anpassungsgüte der Daten haben ebenso einen Einfluss.

Die Pixelgrößenbestimmung und Kalibrierung des EMCCD-Kamerachips spielen eine zentrale Rolle bei der Rückführung der DNA-Origami-Messergebnisse auf die SI-Einheiten [112]. Es wurde eine ununterbrochene Kette von Messungen mit dazugehörigen Messunsicherheiten (s. Abbildung 5.20 b) durchgeführt. Dafür wurde ein kommerziell erworbenes Objektmikrometer der Firma POG Präzisionsoptik Gera GmbH benutzt, welches von der PTB rückführbar kalibriert wurde. Dieses kalibrierte Objektmikrometer wurde dann zur Bestimmung der Pixelgröße und derer Messunsicherheit von drei Mikroskopen (1-3) eingesetzt. Darauf basierend wurde zum Schluss ein Messunsicherheitsbudget für die Abstandsbestimmung an DNA-Origami-Nanometerlinealen aufgestellt.

### 5.3.2 Aufstellung des Messunsicherheitsbudgets

Das benutzte Objektmikrometer ist ein Glassubstrat mit einer Teilungsstruktur: es ist 2 mm breit und besitzt 200 Skalenteile. Somit betrug der kleinste Teilungsabstand nominell  $10\text{ }\mu\text{m}$  (s. Abbildung 5.21). Die Kalibrierung des Objektmikrometers wurde von der PTB mit Hilfe eines rückgeführten UV-Durchlichtmikroskops (365 nm) und in einem Rasterscanverfahren durchgeführt (s. Kapitel 4.5). Für die Vermessung dieser Teilungs-



Abbildung 5.21: Mikroskopisches Bild des benutzten Objektmikrometers. Die Abstände zwischen linken (roter Pfeil) und rechten Kanten benachbarter Linienstrukturen waren zu bestimmen. Beim Scannen wurde eine Spaltapertur benutzt (mit einem grünen Pfeil angedeutet), die in der Mitte der gelben gestrichelten Linie lag ( $15\text{ }\mu\text{m}$  von den Enden der kürzeren Teilungsstriche).

abstände wurden die linken (s. Abbildung 5.21, roter Pfeil) und rechten Kantenabstände

benachbarter Linienstrukturen betrachtet. Dafür wurde zunächst eine Achse in einem Abstand von  $15\ \mu\text{m}$  von der Unterkante der kürzeren Teilungsstriche (gelbe gestrichelte Linie) definiert, die als Mitte der ortsfesten Spaltapertur ( $3,7\ \mu\text{m} \times 46\ \text{nm}$  in der Bildebene, grüner Pfeil in Abbildung 5.21) im Scanvorgang fungierte. Dies war notwendig, um die größten Strukturfehler zu vermeiden (Einbuchtungen, s. Linien 5-6). Aufgrund der vorhandenen Strukturfehler und Verunreinigungen des benutzten Objektmikrometers wurde die Messunsicherheit der Kantenabstände im Wert von  $30\ \text{nm}$  mit dem Erweiterungsfaktor  $k = 2$  von der PTB bestimmt, obwohl das benutzte PTB-Mikroskop den Abstand zwischen den Kantenabständen deutlich genauer mit einer erweiterten Messunsicherheit von  $6\ \text{nm}$  ( $k = 2$ ) messen kann (s. Kapitel 4.5). Da der Abstand zwischen den Teilungsstrichen ( $s_{ref}$ ) und dessen Messunsicherheit bekannt ist, bestand der nächste Schritt darin, die mittlere Anzahl der EMCCD-Kamerapixel ( $\langle d \rangle$ ) zwischen den Teilungsstrichen zu bestimmen.

$$P = \frac{s_{ref}}{\langle d \rangle} \quad (5.1)$$

Daraus ließ sich die finale Pixelgröße ( $P$ ) des jeweiligen Mikroskops mit entsprechender Messunsicherheit bestimmen (s. Gleichung 5.1). Dafür wurde das kalibrierte Objektmikrometer auf dem Probentisch jedes Mikroskops (1-3) positioniert, und mit weißem Durchlicht abgebildet. Es wurde darauf geachtet, dass die Teilungsstriche möglichst parallel zu den Pixelspalten orientiert waren. Zur Datenanalyse wurde nur der Bereich betrachtet, der in einem Abstand von ca.  $15\ \mu\text{m}$  (ca. 150 Pixel) von den kürzeren Strichen und eine Breite von ca.  $4\ \mu\text{m}$  (ca. 40 Pixel) hatte (analog zum Messfenster beim Kalibrieren des Objektmikrometers). Der gemessene mittlere Abstand zwischen den Teilungsstrichen ( $d_{mittel}$  in Pixel) (s. Kapitel 4.5) wurde durch zahlreiche identifizierte Unsicherheitsbeiträge  $\delta d$  beeinflusst (s. Modellgleichung 5.2), die in Tabelle 5.1 zusammengefasst wurden.

$$\langle d \rangle = d_{mittel} - \delta d_{winkel} + \delta d_{dr} + \delta d_r + \delta d_{pos} + \delta d_{filter} + \delta d_{ab} \quad (5.2)$$

$\delta d_{winkel}$  beschreibt die nicht perfekte Orthogonalität zwischen den Teilungsstrichen und den EMCCD-Pixelspalten. Der Unsicherheitsbeitrag dieses Einflussfaktors wurde abgeschätzt, indem der Neigungswinkel zwischen den Strichen des Objektmikrometers und den Pixelspalten ermittelt wurde.  $\delta d_{dr}$  berücksichtigen die Verunreinigungen des Objektmikrometers, dessen Standardunsicherheit der PTB-Schätzung entsprach.  $\delta d_r$  steht für die Ungenauigkeiten infolge unscharfer Linienkanten.  $\delta d_{pos}$  beinhaltet die ungenauere Positionierung des Messfensters ( $15\ \mu\text{m}$ -Abstand von unten, mit einer Höhe von ca.  $4\ \mu\text{m}$ ) im Vergleich zu PTB-Messungen.  $\delta d_{filter}$  und  $\delta d_{ab}$  berücksichtigen den Einfluss des Emis-

sionsfilters und nicht-perfekt korrigierter Aberrationen des Objektivs. Der Einfluss des Emissionsfilters wurde abgeschätzt, indem der Kantenabstand in Pixel zwischen Linien 1 und 2 mit und ohne ihn vermessen wurde. Der Einfluss von  $\delta d_{ab}$  wurde schätzungsweise ermittelt, indem der Abstand des Linienpaares an unterschiedlichen Positionen im Bildfeld ermittelt wurde. Abgesehen von  $d_{mittel}$  und von der nicht perfekten Orthogonalität  $\delta d_{winkel}$ , sind die absoluten Zahlenwerte für die restlichen Einflussfaktoren ( $\delta d$ ) nicht bekannt. Es wurde angenommen, dass ihr Erwartungswert Null ist. Dennoch tragen sie quantitativ zur Gesamtmessunsicherheit bei. Die gesamte Messunsicherheit der mittleren Pixelgröße (nm/Pixel) wurde mittels einer Schulungsversion der GUM-Workbench Professional Software bestimmt, indem unter Berücksichtigung von Unsicherheitsbeiträgen einzelner Einflussfaktoren (s. Tabelle 5.1, exemplarisch für Mikroskop 1) Gleichung 5.2 in Gleichung 5.1 eingesetzt wurde. Dabei wurde nur ein einziges Linienpaar (1 - 2) des kali-

Tabelle 5.1: Das Messunsicherheitsbudget für die mittlere Pixelgröße (Mikroskop 1).

Einflussfaktor	u (k = 1)	Beitrag zu u von P (nm/pixel)
$s_{ref}$	15,0 nm	0,15
$d_{mittel}$	0,08 px	0,08
$\delta d_{winkel}$	$1,00 \cdot 10^{-3}$ px	0,001
$\delta d_{dr}$	0,05 px	0,05
$\delta d_r$	0,03 px	0,03
$\delta d_{pos}$	0,02 px	0,02
$\delta d_{filter}$	0,2 px	0,20
$\delta d_{ab}$	0,4 px	0,40

brierten Objektmikrometers benutzt. Daraus ergibt sich für Mikroskop 1 die gemittelte Pixelgröße  $P = 101,05 \pm 1,0$  nm ( $k = 2$ ). Der signifikanteste Einfluss auf die Unsicherheit der Pixelgröße haben Abbildverzerrungen seitens der optischen Bauteile des Mikroskops. Dies führt zu einer positionsabhängigen Variation der Pixelgröße. Anstatt jedes einzelne Pixel aufwendig zu kalibrieren, werden diese Schwankungen in Form eines Unsicherheitsbeitrags berücksichtigt. Die Berechnung der mittleren Pixelgröße sowie derer Messunsicherheit der restlichen Mikroskope (2-3) fand analog statt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst.

Der nächste Schritt bestand in der Aufstellung des Messunsicherheitsbudgets für die superaufgelösten Abstände zwischen den Markierungen der DNA-Origami-Strukturen. Dabei wurde erneut eine Modellgleichung (s. Gleichung 5.3) mit entsprechenden beitragenden Unsicherheiten aufgestellt. Der durch die Superauflösungsmessungen an den 2D-Mikroskopen (1-3) zu ermittelnde Abstand (in nm) zwischen den Markierungen ist eigentlich eine Projektion ( $a_{proj}$ ) des tatsächlichen 3D-Abstands (s. Gleichung 5.3). Dabei



Tabelle 5.2: Zusammenfassung der Bestimmung der mittleren Pixelgröße und deren Messunsicherheit nach GUM für alle drei Mikroskope ( $k=2$ ).

Mikroskop	Pixelgröße (nm/px)
1	$101,05 \pm 1,0$
2	$95,6 \pm 1,2$
3	$99,9 \pm 1,1$

ist  $P$  die mittlere Pixelgröße (in nm/Pixel),  $d$  (in Pixel) ist die gemessene Projektion des Abstandes zwischen den jeweiligen Markierungen und  $\sum_j \delta d_j$  ist die Summe der identifizierten Einflussfaktoren.

$$a_{proj} = P(d + \sum_j \delta d_j) \quad (5.3)$$

Gleichung 5.3 wurde erweitert, da der zu ermittelnde Abstand (in nm) zwischen den Markierungen einen Mittelwert vieler DNA-Origami-Strukturen  $\bar{a}_{proj}$  darstellt (s. Gleichung 5.4).

$$\bar{a}_{proj} = P \left( \frac{1}{n} \sum_j (d_j + \delta d_{fit,j}) + \delta d_{blink} + \delta d_{umgeb} + \delta d_{fp} + \delta d_{mod} \right) \quad (5.4)$$

Dabei ist  $d_j$  der gemessene Markierungsabstand, also 2D-Projektion, der  $j$ -ten DNA-Origami-Struktur.  $d_j$  umfasst mögliche intrinsische geometrische Inhomogenität der Probe, die z.B. auf den Einsatz der DNA als Baumaterial und auf individuelle Design-bedingte Schwankungen zurückzuführen sind.  $n$  ist die Anzahl der ausgewerteten DNA-Origami-Strukturen, die im Schnitt ca. 500 betrug.  $\delta d_{fit}$  berücksichtigt die Fitfehler jedes einzelnen Doppelspots.  $\delta d_{blink}$  umfasst den Einfluss der Farbstoff-Blinkkinetik im Laufe der TIRF-Aufnahmen (Doppellokalisierungen, s. Kapitel 3.2.2).  $\delta d_{umgeb}$  korrigiert die Umgebungseinflüsse (Temperatur, Salzkonzentration, laterale Drift).  $\delta d_{fp}$  berücksichtigt alle falschpositiven Signale bzw. als DNA-Origami fälschlicherweise identifizierte supraaufgelöste Objekte.  $\delta d_{model}$  beinhaltet die Unsicherheit infolge des benutzten Evaluierungsmodells (s. Gleichung 4.5). Es wurde angenommen, dass der Erwartungswert dieser  $\delta d$ -Einflussfaktoren gleich Null ist. Trotzdem haben sie Messunsicherheiten, die größer sind als Null, und somit haben sie einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf das gesamte Messunsicherheitsbudget.

Durch Monte-Carlo-Simulationen der Aufnahmebedingungen (M. Raab, s. Kapitel 4.8.5) konnten einige der aufgeführten Einflussfaktoren abgeschätzt werden. Dies ermöglicht Betrachtung einzelner Einflussfaktoren unabhängig voneinander. Bei dem Blinkverhalten  $\delta d_{blink}$  ist das Verhältnis aus der Dauer des Anzustandes zu der Dauer des Auszustands

(tON/tOFF) von enormer Bedeutung (s. Kapitel 3.2.2). Insgesamt würde ein zu hohes tON/tOFF-Verhältnis zu kürzeren Abständen aufgrund der Doppellokalisierungen führen. Der Vorteil der DNA-PAINT-Superauflösungsmethode besteht darin, dass sich sowohl die Dauer der Anzustände über die Länge als auch die Dauer der Auszustände über die Konzentration der Atto655-DNA-PAINT-Stränge sehr gut einstellen lässt. Dadurch ist eine systematische Verkürzung der Abstände durch Doppellokalisierungen so gut wie vernachlässigbar. Dennoch wurde ein entsprechender Beitrag zur Messunsicherheit aufgrund der Blinkkinetik über die statistische Unsicherheit der Monte-Carlo-Simulationen auf 0,1 nm geschätzt (s. Abbildung 9.11). Der Einfluss der Umgebung ( $\delta d_{umgeb}$ ) in Form von  $MgCl_2$ -Konzentrationsabhängigkeit auf die DNA-Origami-Strukturen und dementsprechend auf den gemessenen mittleren Abstand zwischen den Markierungen wurde 2014 demonstriert [84]. Dabei wurde ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit der mittleren Abstände bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen gezeigt. Die durchgeführte Kalibrierung gilt nur für die Probe, deren Salzkonzentration bei allen Messungen konstant war. Somit kann der Einfluss der Salzkonzentration vernachlässigt werden. Des Weiteren können Temperaturschwankungen eine Probendrift verursachen, im äußersten Fall zu einer massiven Verzerrung der aufgelösten Struktur und Abstände führt. Aufgrund konstant gehaltener Temperatur (Klimaanlage) und spezieller Antidrift-Vorrichtungen (nosepiece stage und aktiv stabilisierender optischer Tisch) konnte der Drifteffekt drastisch minimiert werden. Es blieb jedoch eine Restunsicherheit von ca. 0,5 nm, bei der jede vorhandene restliche Mikroskopdrift nicht wahrnehmbar war. Ferner trägt auch die Identifizierung der supraaufgelösten Objekte als DNA-Origami-Strukturen zur Messunsicherheit ( $\delta d_{fp}$ ) bei. Dazu gehören unter anderem zufällig, dicht nebeneinander immobilisierte DNA-Origami-Strukturen, deren supraaufgelöste einzelne Spots nicht eindeutig zuzuordnen sind. Auch DNA-Origami-Strukturen mit Defekten z.B. mit nur einer Markierung anstatt von zwei können auftreten. Liegen solche Strukturen innerhalb des erwarteten Abstands, werden sie fälschlicherweise für DNA-Origami-Strukturen gehalten. Auch Lokalisierungen infolge unspezifischer Wechselwirkung von Atto655-Strängen mit der Lab-Tek-Oberfläche können als falsch-positive Signale gewertet werden. Um den Effekt näherungsweise abzuschätzen, wurde ein automatischer DNA-Origami-Struktur-erkennender Algorithmus mit und ohne nachträglicher manueller Auslese der Doppelspots angewandt (s. Abbildung 9.8). Der Nachteil der nachträglichen manuellen Auslese der Strukturen besteht in erhöhter Subjektivität der Ergebnisse. Der Unterschied zwischen den beiden Auswertevorgehensweisen bestand in ca. 0,7 nm. Da es weiterhin eine gewisse Unsicherheit bezüglich der restlichen Zufälligkeit der abgebildeten Doppelspots bestand, wurde somit der Wert auf 1,5 nm er-

höht. Ferner wurde eine rechteckige Wahrscheinlichkeitsverteilung angenommen, die eine Standardunsicherheit von ca. 0,9 nm ( $k=1$ ) ergab. Um den Einfluss des zur Abstandsbestimmung benutzten Modells,  $\delta d_{mod}$ , (Gleichung 4.5) auf das Unsicherheitsbudget abzuschätzen, wurden Simulationen vorgenommen. Dabei wurden Doppelspots im Abstand von 30 nm (Sollwert) mit unterschiedlichen Standardabweichungen der Lokalisierungswolken simuliert (s. Abbildung 9.9). Die Abweichungen zwischen dem Sollwert und dem evaluierten Abstand unter Berücksichtigung der experimentell gewonnenen Standardabweichungen (ca. 5 nm aus DNA-PAINT-Messungen, s. Abbildung 5.19 d) lieferte einen Unsicherheitsbeitrag von ca. 0,5 nm bzw. 0,005 Pixel. Darüber hinaus wurden Doppelspot-Strukturen mit einem Soll-Abstand von 30 nm simuliert, bei denen die Einflussparameter (z.B. Photonenzahl, Markierungseffizienz) Schwankungen einer Normalverteilung mit praxisorientierten Standardabweichungen unterlagen (s. Tabelle 9.2). Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf die Standardabweichung der simulierten Abstände gelegt, indem sie von 0 nm bis 5 nm variiert wurde. Dadurch konnte mögliche intrinsische probenbezogene geometrische Inhomogenität  $u(d_j)$  abgeschätzt werden. Sehr interessante Rückschlüsse ließen sich ziehen, wenn zunächst der Wert 0 nm betrachtet wird. Die ermittelte Standardabweichung des Abstands betrug nur ca. 1 nm. Hingegen lieferten simulierte Standardabweichungen im Wert von 4–5 nm eine Abstandsverteilung, die der experimentell gewonnenen sehr ähnelte (ebenso 4–5 nm, s. Abbildung 9.10). Das ist ein Hinweis darauf, dass eine der Hauptquellen der Heterogenität der gemessenen Abstände aus den intrinsischen strukturellen Schwankungen der DNA-Origami-Strukturen stammen. Dies kann durch Verformungen infolge Defekte einzelner DNA-Origami-Strukturen oder durch ihre 3D-Orientierung auf der Oberfläche (nur die 2D-Projektion wurde gemessen) zustande kommen. Die Unsicherheit dieser Einflussgröße wurde daher schätzungsweise mit 5 nm (0,05 Pixel) beziffert. Obwohl dieser Effekt einen nicht unerheblichen Einfluss hat, wird dessen Beitrag zur Messunsicherheit durch den Mittelungsprozess und hohe Anzahl der ausgewerteten Doppelspots (also Standardfehler, s. Gleichung 5.4) relativiert. Des Weiteren wurde der Einfluss des Fitfehlers aus der Anpassung der oben erwähnten Funktion (Gleichung 4.5) an die Daten. Der Messunsicherheitsbeitrag von  $\delta d_{fit}$  wurde aus dem mittleren Fehler des Fitparameters zur Abstandsbestimmung gewonnen. Die Messunsicherheitsbeiträge der betrachteten Einflussgrößen sind in Tabelle 5.3 für Mikroskop 1 zusammengefasst.

Tabelle 5.3: Messunsicherheitsbudget für die Bestimmung des mittleren Abstands  $\bar{a}_{proj}$  zwischen den Markierungen der rechteckigen DNA-Origami-Strukturen (Mikroskop 1). Erweiterte Messunsicherheit:  $u = 2,4$  nm für  $k = 2$ .

Einflussfaktor	$u$ ( $k = 1$ )	Beitrag zu $u$ von $\bar{a}_{proj}$ (nm)
$P$	0,5 nm/px	0,3
$d_j$	0,05 px	0,16
$\delta d_{fit,j}$	0,0035 px	0,01
$\delta d_{umgeb}$	0,005 px	0,5
$\delta d_{blink}$	0,001 px	0,1
$\delta d_{fp}$	0,009 px	0,9
$\delta d_{mod}$	0,005 px	0,5

Die mittleren Abstände  $\bar{a}_{proj}$  und die resultierende Gesamtmessunsicherheit für alle drei Mikroskope sind der in Abbildung 5.22 dargestellt. Laut GUM-Software betrug die erweiterte Messunsicherheit 2,4 nm ( $k = 2$ ) für alle Mikroskope.

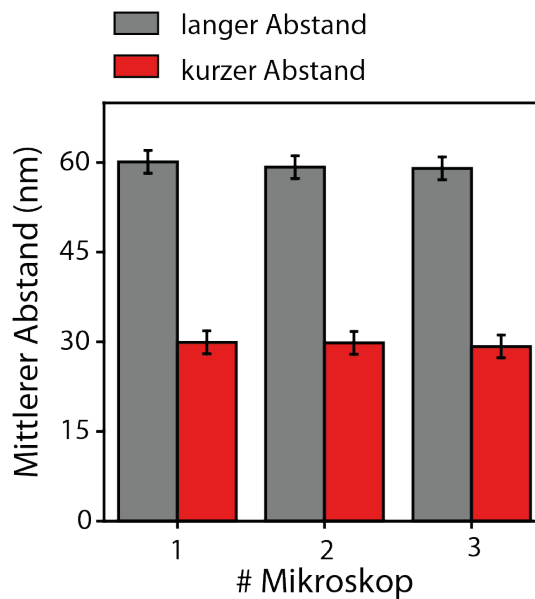


Abbildung 5.22: Mittlere Abstände zwischen zwei Markierungen auf den rechteckigen DNA-Origami-Strukturen (mit den theoretischen Abstandswerten von 65 nm und 32,5 nm), die an drei unterschiedlichen kalibrierten TIRF-Mikroskopen gemessen wurden:  $59,0 \pm 2,4$  nm und  $29,1 \pm 2,4$  nm (Mikroskop 1);  $58,8 \pm 2,4$  nm und  $28,8 \pm 2,4$  nm (Mikroskop 2);  $58,6 \pm 2,4$  nm und  $28,9 \pm 2,4$  nm (Mikroskop 3). Fehler sind als erweiterte Messunsicherheit mit  $k = 2$  nach GUM angegeben [112].

Die wichtigsten Beiträge zur Messunsicherheit der Abstände sind auf die finale Pixelgröße des EMCCD-Kamerachips und den Identifizierungsprozess der DNA-Origami-Strukturen zurückzuführen. Die Ergebnisse aller 3 Mikroskope lagen in einem Intervall von ca. 1 nm. Obwohl die gemessenen Abstandswerte im Schnitt ca. 3-5 nm von den theoretischen Design-Abständen abweichen, weisen sie eine sehr hohe Reproduzierbarkeit und vor allem Vergleichbarkeit auf unabhängig davon, an welchem Mikroskop die Messungen durchgeführt wurden.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag darauf, die qualitative und quantitative Anwendungsmöglichkeiten der strukturellen DNA-Origami-Nanotechnologie in der Fluoreszenzmikroskopie zu erweitern.

Zunächst wurden Untersuchungen zur Optimierung der photophysikalischen Eigenschaften fluoreszierender Moleküle im Hinblick auf die lokalisierungsbasierte Superauflösungsmikroskopie durchgeführt. dSTORM gehört zu den ersten etablierten lokalisierungsbasierten Superauflösungsmethoden, die auf der Entdeckung des reversiblen Photoschaltens der rot-absorbierenden Cyanin-Farbstoffe (Cy5, Alexa647) unter Einsatz von aliphatischen Thiolen und einer blau-verschobenen Lichtquelle (z.B. UV) basiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit dSTORM durch weitere chemische Zusätze optimiert werden kann. Ein besonderes Augenmerk lag auf der Erhöhung der Photonenzahlen pro Anzustand bzw. Lokalisierung in dSTORM durch den Einsatz von Triplett-Quenchern wie COT und ROXS. Unter TIRF-Aufnahmebedingungen konnte im Falle beider Triplett-Quencher eine Verlängerung der Anzustände beobachtet werden, was auf die konkurrierenden Prozesse zwischen  $\beta$ -Mercaptoethanol (ME) und Triplett-Quencher (COT, ROXS) um die Entvölkerung der Triplett-Zustände zurückzuführen ist. Andererseits konnten störende Wechselwirkungen zwischen ROXS und höchstwahrscheinlich dem dunklen Zustand infolge einer ME-Addition an die Doppelbindung der Cyanin-Farbstoffe festgestellt werden, welche sich in Form von verkürzten Auszuständen äußerten. Allerdings konnte die Dauer der Auszustände durch den Einsatz geringerer Leistung der Reaktivierungslichtquelle (UV) verlängert werden. Die Zunahme der Photonenzahl pro Lokalisierung konnte für alle betrachteten Fälle durch den Einsatz höherer Laseranregungsleistungen realisiert werden und im Hinblick auf Superauflösungsmikroskopie anhand fluoreszenzmarkierter DNA-Origami-Nanometerlineale in Form von sogenannten Doppelspots demonstriert werden. Insgesamt konnte eine Verdreifachung der Photonenzahl pro Lokalisierung unter beiden Triplett-Quenchern im Vergleich zu dSTORM ohne Zusätze beobachtet werden. Allerdings hat diese Herangehensweise im Allgemeinen eine naturgegebene Limitierung. Durch die Erhöhung der Photonenzahl pro Anzustand wird die Anzahl der erhaltenen Lokalisierungen pro Farbstoffmolekül in Mitleidenschaft gezogen. Das Gesamtphotonenbudget der einzelnen Farbstoffmoleküle wird innerhalb von wenigen Lokalisierungen aufgebraucht. Daher erscheint diese Kombination aus dSTORM und Triplett-Quenchern für solche Proben von Vorteil zu sein, die eine sehr hohe Markierungsdichte haben.

Im Allgemeinen ist die dSTORM-Superauflösungsmethode unter Verwendung von rot-absorbierenden Cyanin-Fluoreszenzfarbstoffen auf die essentiellen chemischen Zusätze wie ME und Sauerstoffentzugssystem angewiesen, die nicht mit jedem zu untersuchenden System kompatibel ist. Daher stellen sogenannte spontan blinkende Fluoreszenzfarbstoffe [16] eine konkurrenzfähige Alternative dar, die momentan Gegenstand aktueller Forschung sind. Dabei handelt es sich um Si-Rhodamin-Derivate, die sich im thermischen Gleichgewicht abhängig vom externen pH-Wert zwischen der offenen fluoreszierenden Form und dem Dunkelzustand infolge einer intramolekularen Ringschließung befinden. Neben der fehlenden Notwendigkeit zu chemischen Zusätzen sowie zum Einsatz des phototoxischen UV-Lichts, besteht ein zusätzlicher Vorteil dieser Farbstoffe darin, dass sie in geschlossener und somit ladungsneutraler Form zellpermeabel sind. Dagegen sind die meisten organischen Fluoreszenzfarbstoffe inklusive der rot-absorbierenden Cyanine hydrophil und somit kaum zellpermeabel. Das Photonenbudget pro Anzustand der spontan blinkenden Farbstoffe ähnelt dem der dSTORM-Methode, wobei aktuell fieberhaft an möglichen chemischen Modifikationen des Fluorophorzentrums zur Erhöhung der Quantenausbeute geforscht wird. Bis *dato* wird die DNA-PAINT-Methode als Rekordhalter im Hinblick auf die höchsten praktisch realisierbaren Photonenzahlen pro Lokalisierung (bis zu 50.000) unter den am häufigsten angewandten lokalisierungsbasierten Superauflösungstechniken angesehen. Dennoch stellt DNA-PAINT aus experimenteller Sicht hohe Anforderungen, insbesondere in Bezug auf Untersuchungen in lebende Zellen, da jedes Zielmolekül einen DNA-Ankerstrang zum Anbinden der frei schwimmenden fluoreszenzmarkierten DNA-PAINT-Stränge im nM-Bereich tragen muss.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit bestand darin, die Fluoreszenzmarkierungen für DNA-Origami-Nanostrukturen mit fluoreszierenden Proteinen zu erweitern. Fluoreszierende Proteine sind weit verbreitete genetisch kodierte Fluoreszenzmarker, die jedoch in ihren photophysikalischen Eigenschaften (Helligkeit, Photostabilität) den synthetischen organischen Fluoreszenzfarbstoffen unterlegen sind. Es wurde untersucht, wie fluoreszierende Proteine am Beispiel von EYFP und unter Zuhilfenahme der DNA-Origami-Strukturen im Hinblick auf die lokalisierungsbasierte Superauflösungsmikroskopie durch externe Einflussfaktoren, wie z.B. dSTORM-Bedingungen, optimiert werden können. Bekanntlich weisen EYFP-Moleküle ein intrinsisches Blinkverhalten im ms-Bereich sowie langlebige Dunkelzustände unter physiologischen Bedingungen auf aufgrund des Protolysegleichgewichts und der cis-trans-Isomerisierung des Fluorophorzentrums. Zum Immobilisieren an die DNA-Origami-Strukturen *via* DNA-Hybridisierung wurden EYFP-

Moleküle mit einem DNA-Strang unter Erhalt der Fluoreszenzfähigkeit sowie der strukturellen und biochemischen Intaktheit stöchiometrisch kontrolliert gekoppelt. Die TIRF-Einzelmolekülmessungen von solchen mit jeweils einem EYFP-Molekül markierten Konstrukten unter dSTORM-Bedingungen offenbarten einen starken stabilisierenden Effekt, indem die Fluoreszenzfluktuationen im ms-Bereich um den Faktor 5 zeitlich länger aufrechterhalten werden konnten. Bei allen Einzelkomponenten der dSTORM-Pufferzusammensetzung (Sauerstoffentzug/ME/Tris-Puffer) blieb dieser Effekt aus. Im Anschluss wurden die Beobachtungen aus den photophysikalischen Untersuchungen einzelner EYFP-Moleküle mit Superauflösungsmessungen verifiziert. Dabei konnten DNA-Origami-Teststrukturen, die mit zwei Markierungen bestehend aus mehreren EYFPs in einem Abstand von mindestens ca. 100 nm ausgestattet waren, in guter Qualität unter dSTORM in Form von Doppelspots aufgelöst werden. Dabei handelte sich um die erste realisierte superaufgelöste DNA-Origami-Teststruktur unter Verwendung von fluoreszierenden Proteinen. Diese Qualitätssteigerung der superaufgelösten Bilder unter dSTORM-Bedingungen wurde auf die Erhöhung der Lokalisierungszahl um den Faktor 5 infolge der gesteigerten Photostabilität zurückgeführt. Analoge Superauflösungsergebnisse wurden aus den Zellmessungen von EYFP-markierten Mikrotubuli-Strukturen ohne Beteiligung der DNA erhalten. Aufgrund der strukturellen Komplexität und der Fülle der Einflussfaktoren auf das Fluorophorzentrum im Inneren fluoreszierender Proteine bedarf die Aufklärung des dSTORM-Wirkungsmechanismus weiterer Untersuchungen. Gezielte Mutationen der dem Fluorophorzentrum naheliegenden Aminosäuren oder ein Vergleich der mit EYFP eng verwandten FP-Analoga können möglicherweise bei der Aufklärung des Mechanismus behilflich sein.

Aktuell entwickelt sich die lokalisierungsbasierte Superauflösungsmikroskopie von einer qualitativen bildgebenden Methode jenseits der Beugungsgrenze zu einer quantitativen Charakterisierungsmethode der zu untersuchenden Systeme. Dabei spielt die mittlere Anzahl der Lokalisierungen pro Fluoreszenzmarker eine zentrale Rolle, um die Verteilung der fluoreszenzmarkierten Zielmoleküle innerhalb z.B. einer innerzellulären superaufgelösten Struktur genau zu bestimmen und sogar weiter zu diagnostischen Zwecken einzusetzen. Da fluoreszierende Proteine als am weitesten verbreitete Fluoreszenzmarker in zellulären Untersuchungen eingesetzt werden, bedarf dieses nächste Entwicklungsstadium der Superauflösungsmikroskopie einer etablierten und zuverlässigen Strategie zu kontrollierter Immobilisierung und eindeutiger Identifizierung sowie Charakterisierung von einzelnen fluoreszierenden Proteinen. Eine dieser möglichen Strategien unter Einsatz von der DNA-Origami-Technik wurde im Rahmen dieser Arbeit erarbeitet und präsentiert. Des Weiteren



konnte gezeigt werden, dass die präsentierte Konjugations- und Immobilisierungsmethode auf weitere Klassen der fluoreszierenden Proteine wie z.B. photoaktivierbares PAmCherry ausgeweitet werden kann (s. Abbildung 6.1).

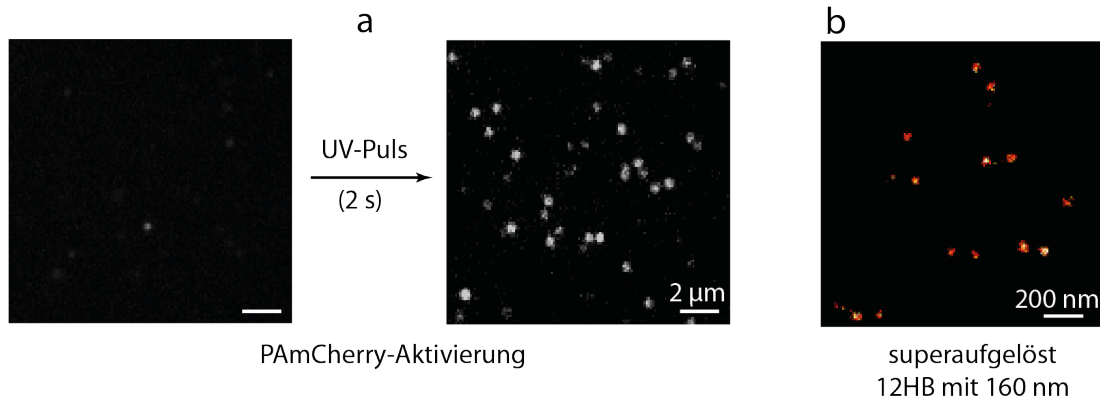


Abbildung 6.1: PALM-Superauflösungsmikroskopie von 12-Helixbündel-DNA-Origami-Strukturen, die mit PAmCherry-DNA-Konjugaten in einem Abstand von 160 nm markiert wurden. (a) Exemplarische TIRF-Bilder vor und nach der Reaktivierung mit UV-Licht, (b) superaufgelöstes Bild.

Ein weiterer Entwicklungsschritt der Superauflösungsmikroskopie zu einer quantitativen Charakterisierungsmethode bestand darin, die Anwendung von DNA-Origami-Nanometerlinealen im Bereich der Nanometrologie zu demonstrieren. Nanometrologie ist ein Forschungsfeld, das sich unter anderem mit der messtechnischen Rückführung der Eigenschaften von Objekten auf der Nanoskala beschäftigt. Die Herausforderungen bestehen häufig im komplexen physikalischen Verhalten nanoskopischer Objekte, welches z.B. aufwändig zu kontrollieren oder durch quantenmechanische Effekte beeinflusst sein kann. Nur rückgeführte Messwerte, welche mit unterschiedlichen Instrumenten gemessen wurden, legitimieren die Vergleichbarkeit derer untereinander. Da DNA-Origami-Nanometerlineale weltweit als Teststrukturen für die Superauflösungsmikroskopie eingesetzt werden, bedarf es der Etablierung einer einheitlichen nanometrologischen Herangehensweise an die Bestimmung der Messunsicherheit nach GUM, die in Kooperation mit der PTB Braunschweig entwickelt wurde. Zu nanometrologischen Zwecken wurde die DNA-PAINT-Superauflösungsmethode an drei unterschiedlichen TIRF-Mikroskopen verwendet, da diese am effektivsten zu kontrollieren ist und die beste Datenqualität unter lokalisierungsbasierten Methoden liefert. Die unmittelbare Rückführung der superaufgelösten DNA-Origami-Abstände bestand in der Kalibrierung der Kamerapixelgröße mit Hilfe eines rückführbar kalibrierten Objektmikrometers für jedes der benutzten TIRF-Mikroskope. Daraus konnten die erhaltenen Superauflösungslokalisierungsdaten von Pixeln in Nanometer umgerechnet wer-

den, um anschließend die Abstandsinformationen zwischen den Fluoreszenzmarkierungen auf der Basis der SI-Einheit zu gewinnen. Die Schwierigkeiten der Nanometrologie bestehen in der Komplexität und Fülle der Einflussfaktoren, die identifiziert und derer Standardmessunsicherheiten für GUM quantitativ abgeschätzt werden müssen. Einige dieser Einflussfaktoren wie z.B. das Blinkverhalten oder die Breite der Lokalisierungswolke konnten nur anhand von Monte-Carlo-Simulationen abgeschätzt werden. *Summa summarum* stammen die maßgeblichen Unsicherheitsbeiträge aus dem Auswertungsprozess in Form von Identifikation der DNA-Origami-Strukturen als supraaufgelöste Doppelpots und verwendetem Evaluierungsmodell zur Abstandsbestimmung. Trotz herausragender Eigenschaften der DNA-Origami-Nanotechnologie können diese Nanostrukturen Faltungsfehler oder strukturelle Spannungen und somit Heterogenitäten aufweisen. Dadurch kann der mittlere Abstand vom theoretischen Wert abweichen, was durch die durchgeführten DNA-PAINT-Experimente an fluoreszenzmarkierten rechteckigen DNA-Origami-Strukturen bestätigt wurde (theoretisch: 65 - 32,5 nm, gemessen: 59 - 29 nm). Der Effekt dieser strukturellen Heterogenitäten auf die kombinierte Messunsicherheit der Abstände wird statistisch durch eine große Zahl ausgewerteter Strukturen verkleinert. Somit ist der Einsatz der DNA-Origami-Technik als Längen- bzw. Auflösungsstandard auf eine große Zahl der evaluierten supraaufgelösten Strukturen angewiesen. Dennoch weisen fluoreszenzmarkierte DNA-Origami-Nanostrukturen eine enorme Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit gemessener mittlerer Abstände auf. Dies ist unabhängig davon, wann und an welchem Mikroskop gemessen wurde. Der erhaltene mittlere Abstand ist streng genommen eine 2D-Projektion des tatsächlichen Abstands. Eine zunehmende Oberflächenrauheit würde den Abstand deutlich verkürzen. Schätzungsweise ist dieser Effekt für die verwendete BSA-Biotin-NeutrAvidin-Passivierung relativ gering, da es Fälle gibt, bei denen der aufgelöste mittlere Abstand genau mit dem designten theoretischen Wert bei gleicher Immobilisierungsmethode übereinstimmt [84]. Insgesamt wurden kombinierte erweiterte Messunsicherheiten ( $k = 2$ ) im Wert von 2,4 nm für alle drei benutzte TIRF-Mikroskope und zwei aufzulösende Abstände ermittelt. Der Beitrag der mikroskopspezifischen Messunsicherheiten ist in allen drei Fällen sehr ähnlich. Somit sind die kombinierten Messunsicherheiten der Abstände für drei Mikroskope sehr ähnlich.

Neben den lateralen Abstandsmessungen können DNA-Origami-Strukturen auch für die axiale Längenskala eingesetzt werden. Allgemein ist die axiale Auflösung etwas schlechter als die laterale und die Vermessung gestaltet sich deutlich aufwendiger. Daher soll im nächsten Schritt die nanometrologische Betrachtung auf 3D-Messungen ausgeweitet werden. Da lokalisierungsbasierte Superauflösungsmikroskopie nur eine der gängigen Su-

perauflösungstechniken ist, soll so ein Kalibrierprozess unter Berücksichtigung jeweiliger technischen Besonderheiten für andere Methoden (STED, SIM) entwickelt werden. Dies würde die Vergleichbarkeit der Messergebnisse unterschiedlicher Superauflösungsmethoden gewährleisten.

## 7 Literatur

- [1] W. E. Moerner and L. Kador (**1989**); “Finding a single molecule in a haystack. Optical detection and spectroscopy of single absorbers in solids,” Analytical Chemistry, 61(21), 1217A–1223A.
- [2] M. Orrit and J. Bernard (**1990**); “Single pentacene molecules detected by fluorescence excitation in a p-terphenyl crystal,” Physical review letters, 65(21), 2716–2719.
- [3] J. Vogelsang, R. Kasper, C. Steinhauer, B. Person, M. Heilemann, M. Sauer and P. Tinnefeld (**2008**); “A Reducing and Oxidizing System Minimizes Photobleaching and Blinking of Fluorescent Dyes,” Angewandte Chemie International Edition, 47(29), 5465–5469.
- [4] M. Heilemann, E. Margeat, R. Kasper, M. Sauer and P. Tinnefeld (**2005**); “Carbocyanine dyes as efficient reversible single-molecule optical switch,” Journal of the American Chemical Society, 127(11), 3801–3806.
- [5] G. T. Dempsey, M. Bates, W. E. Kowtoniuk, D. R. Liu, R. Y. Tsien and X. Zhuang (**2009**); “Photoswitching mechanism of cyanine dyes,” Journal of the American Chemical Society, 131(51), 18192–18193.
- [6] T. A. Klar and S. W. Hell (**1999**); “Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy,” Optics Letters, 24(14), 954.
- [7] E. Betzig (**1995**); “Proposed method for molecular optical imaging,” Optics Letters, 20(3), 237–239.
- [8] M. Bates, B. Huang, G. T. Dempsey and X. Zhuang (**2007**); “Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes,” Science (New York, N.Y.), 317(5845), 1749–1753.
- [9] R. Jungmann, C. Steinhauer, M. Scheible, A. Kuzyk, P. Tinnefeld and F. C. Simmel (**2010**); “Single-molecule kinetics and super-resolution microscopy by fluorescence imaging of transient binding on DNA origami,” Nano letters, 10(11), 4756–4761.
- [10] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz and H. F. Hess (**2006**); “Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution,” Science (New York, N.Y.), 313(5793), 1642–1645.

- [11] P. W. K. Rothemund (**2006**); “Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns,” Nature, 440(7082), 297–302.
- [12] P. Wang, T. A. Meyer, V. Pan, P. K. Dutta and Y. Ke (**2017**); “The Beauty and Utility of DNA Origami,” Chem, 2(3), 359–382.
- [13] A. Jablonski (**1933**); “Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes,” Nature, 131(3319), 839–840.
- [14] A. L. Mattheyses, S. M. Simon and J. Z. Rappoport (**2010**); “Imaging with total internal reflection fluorescence microscopy for the cell biologist,” Journal of cell science, 123(Pt 21), 3621–3628.
- [15] R. E. Thompson, D. R. Larson and W. W. Webb (**2002**); “Precise Nanometer Localization Analysis for Individual Fluorescent Probes,” Biophysical journal, 82(5), 2775–2783.
- [16] S.-N. Uno, M. Kamiya, T. Yoshihara, K. Sugawara, K. Okabe, M. C. Tarhan, H. Fujita, T. Funatsu, Y. Okada, S. Tobita and Y. Urano (**2014**); “A spontaneously blinking fluorophore based on intramolecular spirocyclization for live-cell super-resolution imaging,” Nature chemistry, 6(8), 681–689.
- [17] I. Tinoco and R. L. Gonzalez (**2011**); “Biological mechanisms, one molecule at a time,” Genes & development, 25(12), 1205–1231.
- [18] A. A. Deniz, S. Mukhopadhyay and E. A. Lemke (**2008**); “Single-molecule biophysics: at the interface of biology, physics and chemistry,” Journal of the Royal Society, Interface, 5(18), 15–45.
- [19] M. Sauer, J. Hofkens and J. Enderlein (**2011**); Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, ISBN 9783527633500.
- [20] E. M. S. Stennett, N. Ma, A. van der Vaart and M. Levitus (**2014**); “Photophysical and dynamical properties of doubly linked Cy3-DNA constructs,” The journal of physical chemistry. B, 118(1), 152–163.
- [21] D. C. Prasher, V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast and M. J. Cormier (**1992**); “Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein,” Gene, 111(2), 229–233.
- [22] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward and D. C. Prasher (**1994**); “Green

- fluorescent protein as a marker for gene expression,” Science (New York, N.Y.), 263(5148), 802–805.
- [23] F. Yang, L. G. Moss and G. N. Phillips (**1996**); “The molecular structure of green fluorescent protein,” Nature biotechnology, 14(10), 1246–1251.
- [24] M. Orm, A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien and S. J. Remington (**1996**); “Crystal Structure of the *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein,” Science, 273(5280), 1392–1395.
- [25] A. B. Cubitt, R. Heim, S. R. Adams, A. E. Boyd, L. A. Gross and R. Y. Tsien (**1995**); “Understanding, improving and using green fluorescent proteins,” Trends in Biochemical Sciences, 20(11), 448–455.
- [26] R. Y. Tsien (**1998**); “The green fluorescent protein,” Annual review of biochemistry, 67, 509–544.
- [27] G. H. Patterson, S. M. Knobel, W. D. Sharif, S. R. Kain and D. W. Piston (**1997**); “Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy,” Biophysical journal, 73(5), 2782–2790.
- [28] W. B. Frommer, M. W. Davidson and R. E. Campbell (**2009**); “Genetically encoded biosensors based on engineered fluorescent proteins,” Chemical Society reviews, 38(10), 2833–2841.
- [29] D. C. Youvan and M. E. Michel-Beyerle (**1996**); “Structure and fluorescence mechanism of GFP,” Nature biotechnology, 14(10), 1219–1220.
- [30] D. Yarbrough, R. M. Wachter, K. Kallio, M. V. Matz and S. J. Remington (**2001**); “Refined crystal structure of Ds-Red, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution,” Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98(2), 462–467.
- [31] M. V. Matz, A. F. Fradkov, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, A. G. Zaraisky, M. L. Markelov and S. A. Lukyanov (**1999**); “Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species,” Nature biotechnology, 17(10), 969–973.
- [32] S.-K. Ko, X. Chen, J. Yoon and I. Shin (**2011**); “Zebrafish as a good vertebrate model for molecular imaging using fluorescent probes,” Chemical Society reviews, 40(5), 2120–2130.

- [33] B. P. Cormack, R. H. Valdivia and S. Falkow (**1996**); “FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP),” Gene, 173(1), 33–38.
- [34] U. Haupts, S. Maiti, P. Schwille and W. W. Webb (**1998**); “Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy,” Proceedings of the National Academy of Sciences, 95(23), 13573–13578.
- [35] R. M. Wachter, M.-A. Elsliger, K. Kallio, G. T. Hanson and S. J. Remington (**1998**); “Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein,” Structure, 6(10), 1267–1277.
- [36] R. M. Dickson, A. B. Cubitt, R. Y. Tsien and W. E. Moerner (**1997**); “On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein,” Nature, 388(6640), 355–358.
- [37] J. S. Biteen, M. A. Thompson, N. K. Tselentis, G. R. Bowman, L. Shapiro and W. E. Moerner (**2008**); “Super-resolution imaging in live *Caulobacter crescentus* cells using photoswitchable EYFP,” Nature methods, 5(11), 947–949.
- [38] A. Gahlmann and W. E. Moerner (**2013**); “Exploring bacterial cell biology with single-molecule tracking and super-resolution imaging,” Nature Reviews Microbiology, 12(1), 9–22.
- [39] G. U. Nienhaus (**2008**); “The green fluorescent protein: a key tool to study chemical processes in living cells,” Angewandte Chemie (International ed. in English), 47(47), 8992–8994.
- [40] Y. Wang, J. Y.-J. Shyy and S. Chien (**2008**); “Fluorescence proteins, live-cell imaging, and mechanobiology: seeing is believing,” Annual review of biomedical engineering, 10, 1–38.
- [41] N. C. Shaner, G. H. Patterson and M. W. Davidson (**2007**); “Advances in fluorescent protein technology,” Journal of cell science, 120(Pt 24), 4247–4260.
- [42] S. Wang, J. R. Moffitt, G. T. Dempsey, X. S. Xie and X. Zhuang (**2014**); “Characterization and development of photoactivatable fluorescent proteins for single-molecule-based superresolution imaging,” Proceedings of the National Academy of Sciences, 111(23), 8452–8457.
- [43] M. Heilemann, S. van de Linde, A. Mukherjee and M. Sauer

- (**2009**); “Super-Resolution Imaging with Small Organic Fluorophores,” Angewandte Chemie International Edition, 48(37), 6903–6908.
- [44] C. E. Aitken, R. A. Marshall and J. D. Puglisi (**2008**); “An oxygen scavenging system for improvement of dye stability in single-molecule fluorescence experiments,” Biophysical journal, 94(5), 1826–1835.
- [45] T. Ogawa, N. Yanai, A. Monguzzi and N. Kimizuka (**2015**); “Highly Efficient Photon Upconversion in Self-Assembled Light-Harvesting Molecular Systems,” Scientific reports, 5, 10882.
- [46] M. Bates, T. R. Blosser and X. Zhuang (**2005**); “Short-range spectroscopic ruler based on a single-molecule optical switch,” Physical review letters, 94(10), 108101.
- [47] T. Ha and P. Tinnefeld (**2012**); “Photophysics of fluorescent probes for single-molecule biophysics and super-resolution imaging,” Annual review of physical chemistry, 63, 595–617.
- [48] I. Rasnik, S. A. McKinney and T. Ha (**2006**); “Nonblinking and long-lasting single-molecule fluorescence imaging,” Nature Methods, 3(11), 891–893.
- [49] A. P. Gorka, R. R. Nani and M. J. Schnermann (**2015**); “Cyanine polyene reactivity: scope and biomedical applications,” Organic & biomolecular chemistry, 13(28), 7584–7598.
- [50] T. Cordes, J. Vogelsang and P. Tinnefeld (**2009**); “On the Mechanism of Trolox as Antiblinking and Antibleaching Reagent,” Journal of the American Chemical Society, 131(14), 5018–5019.
- [51] M. Gallarate, M. E. Carloti, M. Trotta and S. Bovo (**1999**); “On the stability of ascorbic acid in emulsified systems for topical and cosmetic use,” International Journal of Pharmaceutics, 188(2), 233–241.
- [52] P. Holzmeister, A. Gietl and P. Tinnefeld (**2014**); “Geminate recombination as a photoprotection mechanism for fluorescent dyes,” Angewandte Chemie (International ed. in English), 53(22), 5685–5688.
- [53] T. N. Das and K. I. Priyadarsini (**1994**); “Triplet of Cyclooctatetraene : Reactivity and Properties,” Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions, 90(7), 963–968.
- [54] S. Schols, A. Kadoshchuk, P. Heremans, A. Helfer and U. Scherf (**2009**); “Tri-



- plet excitation scavenging as method to control the triplet concentration,” in F. So and C. Adachi, editors, SPIE Photonic Devices + Applications, SPIE, SPIE Proceedings, 74150A.
- [55] Juli (2017); “<https://micro.magnet.fsu.edu/primer/lightandcolor/diffractionintro.html>,” Internetseite.
- [56] S. W. Hell and J. Wichmann (1994); “Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy,” Optics Letters, Vol. 19, No. 11 / June 1.
- [57] M. Hofmann, C. Eggeling, S. Jakobs and S. W. Hell (2005); “Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins,” Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(49), 17565–17569.
- [58] A. Pertsinidis, Y. Zhang and S. Chu (2010); “Subnanometre single-molecule localization, registration and distance measurements,” Nature, 466(7306), 647–651.
- [59] S. van de Linde, S. Wolter, M. Heilemann and M. Sauer (2010); “The effect of photoswitching kinetics and labeling densities on super-resolution fluorescence imaging,” Journal of biotechnology, 149(4), 260–266.
- [60] M. Bates, B. Huang and X. Zhuang (2008); “Super-resolution microscopy by nanoscale localization of photo-switchable fluorescent probes,” Current opinion in chemical biology, 12(5), 505–514.
- [61] M. Dai, R. Jungmann and P. Yin (2016); “Optical imaging of individual biomolecules in densely packed clusters,” Nature nanotechnology, 11(9), 798–807.
- [62] M. Raab, J. J. Schmied, I. Jusuk, C. Forthmann and P. Tinnefeld (2014); “Fluorescence microscopy with 6 nm resolution on DNA origami,” Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry, 15(12), 2431–2435.
- [63] F. Balzarotti, Y. Eilers, K. C. Gwosch, A. H. Gynnå, V. Westphal, F. D. Stefani, J. Elf and S. W. Hell (2017); “Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes,” Science (New York, N.Y.), 355(6325), 606–612.

- [64] S. van de Linde, A. Löschberger, T. Klein, M. Heidbreder, S. Wolter, M. Heilemann and M. Sauer (**2011**); “Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes,” Nature Protocols, 6(7), 991–1009.
- [65] M. Heilemann, S. van de Linde, M. Schuttpelz, R. Kasper, B. Seefeldt, A. Mukherjee, P. Tinnefeld and M. Sauer (**2008**); “Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes,” Angewandte Chemie (International ed. in English), 47(33), 6172–6176.
- [66] G. T. Dempsey, J. C. Vaughan, K. H. Chen, M. Bates and X. Zhuang (**2011**); “Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging,” Nature Methods, 8(12), 1027–1036.
- [67] N. Olivier, D. Keller, P. Gönczy, S. Manley and M. Sauer (**2013**); “Resolution Doubling in 3D-STORM Imaging through Improved Buffers,” PloS one, 8(7), e69004.
- [68] F. V. Subach, V. N. Malashkevich, W. D. Zencheck, H. Xiao, G. S. Filonov, S. C. Almo and V. V. Verkhusha (**2009**); “Photoactivation mechanism of PAmCherry based on crystal structures of the protein in the dark and fluorescent states,” Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106(50), 21097–21102.
- [69] K. Nienhaus and G. U. Nienhaus (**2014**); “Fluorescent proteins for live-cell imaging with super-resolution,” Chemical Society reviews, 43(4), 1088–1106.
- [70] P. N. Hedde and G. U. Nienhaus (**2014**); “Super-resolution localization microscopy with photoactivatable fluorescent marker proteins,” Protoplasma, 251(2), 349–362.
- [71] G. M. Cooper (**2000**); The cell: A molecular approach, ASM Press, Washington, DC, 2. ed. edition, ISBN 0-87893-106-6.
- [72] C. Forthmann, J. Schmied and T. Straube (**2016**); “Quantifying the resolution of a Leica SR GSD 3D localization microscopy system with 2D and 3D nanorulers,” Leica Microsystems.
- [73] J. C. Vaughan, S. Jia and X. Zhuang (**2012**); “Ultrabright photoactivatable fluorophores created by reductive caging,” Nature methods, 9(12), 1181–1184.
- [74] J.-B. Chang, F. Chen, Y.-G. Yoon, E. E. Jung, H. Babcock, J. S. Kang, S. Asano, H.-J. Suk, N. Pak, P. W. Tillberg, A. T. Wassie, D. Cai and E. S. Boyden (**2017**); “Iterative expansion microscopy,” Nature methods, 14(6), 593–599.

- [75] E. J. Rees, M. Erdelyi, D. Pinotsi, A. Knight, D. Metcalf and C. F. Kaminski (**2012**); “Blind assessment of localisation microscope image resolution,” Optical Nanoscopy, 1(1), 12.
- [76] H. Ma, R. Fu, J. Xu and Y. Liu (**2017**); “A simple and cost-effective setup for super-resolution localization microscopy,” Scientific reports, 7(1), 1542.
- [77] N. C. Seeman and N. R. Kallenbach (**1983**); “Design of immobile nucleic acid junctions,” Biophysical journal, 44(2), 201–209.
- [78] S. M. Douglas, H. Dietz, T. Liedl, B. Högberg, F. Graf and W. M. Shih (**2009**); “Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes,” Nature, 459(7245), 414–418.
- [79] A. Kuzyk, R. Schreiber, Z. Fan, G. Pardatscher, E.-M. Roller, A. Högele, F. C. Simmel, A. O. Govorov and T. Liedl (**2012**); “DNA-based self-assembly of chiral plasmonic nanostructures with tailored optical response,” Nature, 483(7389), 311–314.
- [80] B. Saccà, R. Meyer, M. Erkelenz, K. Kiko, A. Arndt, H. Schroeder, K. S. Rabe and C. M. Niemeyer (**2010**); “Orthogonal protein decoration of DNA origami,” Angewandte Chemie (International ed. in English), 49(49), 9378–9383.
- [81] H. Bui, C. Onodera, C. Kidwell, Y. Tan, E. Graugnard, W. Kuang, J. Lee, W. B. Knowlton, B. Yurke and W. L. Hughes (**2010**); “Programmable periodicity of quantum dot arrays with DNA origami nanotubes,” Nano letters, 10(9), 3367–3372.
- [82] C. Steinhauer, R. Jungmann, T. L. Sobey, F. C. Simmel and P. Tinnefeld (**2009**); “DNA origami as a nanoscopic ruler for super-resolution microscopy,” Angewandte Chemie (International ed. in English), 48(47), 8870–8873.
- [83] J. J. Schmied, A. Gietl, P. Holzmeister, C. Forthmann, C. Steinhauer, T. Dammeyer and P. Tinnefeld (**2012**); “Fluorescence and super-resolution standards based on DNA origami,” Nature methods, 9(12), 1133–1134.
- [84] J. J. Schmied, M. Raab, C. Forthmann, E. Pibiri, B. Wünsch, T. Dammeyer and P. Tinnefeld (**2014**); “DNA origami-based standards for quantitative fluorescence microscopy,” Nature protocols, 9(6), 1367–1391.
- [85] August (**2017**); “<http://www.gattaquant.com/>,” Internetseite.
- [86] A. Gietl, P. Holzmeister, D. Grohmann and P. Tinnefeld (**2012**); “DNA origa-

- mi as biocompatible surface to match single-molecule and ensemble experiments,” Nucleic acids research, 40(14), e110.
- [87] J. Fu, M. Liu, Y. Liu, N. W. Woodbury and H. Yan (**2012**); “Interenzyme substrate diffusion for an enzyme cascade organized on spatially addressable DNA nanostructures,” Journal of the American Chemical Society, 134(12), 5516–5519.
- [88] E. S. Andersen, M. Dong, M. M. Nielsen, K. Jahn, R. Subramani, W. Mamdouh, M. M. Golas, B. Sander, H. Stark, C. L. P. Oliveira, J. S. Pedersen, V. Birkedal, F. Besenbacher, K. V. Gothelf and J. Kjems (**2009**); “Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid,” Nature, 459(7243), 73–76.
- [89] S. M. Douglas, I. Bachelet and G. M. Church (**2012**); “A logic-gated nanorobot for targeted transport of molecular payloads,” Science (New York, N.Y.), 335(6070), 831–834.
- [90] Q. Jiang, Y. Shi, Q. Zhang, N. Li, P. Zhan, L. Song, L. Dai, J. Tian, Y. Du, Z. Cheng and B. Ding (**2015**); “A Self-Assembled DNA Origami-Gold Nanorod Complex for Cancer Theranostics,” Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany), 11(38), 5134–5141.
- [91] Y. Yang, M. A. Goetzfried, K. Hidaka, M. You, W. Tan, H. Sugiyama and M. Endo (**2015**); “Direct Visualization of Walking Motions of Photocontrolled Nanomachine on the DNA Nanostructure,” Nano letters, 15(10), 6672–6676.
- [92] S. F. J. Wickham, M. Endo, Y. Katsuda, K. Hidaka, J. Bath, H. Sugiyama and A. J. Turberfield (**2011**); “Direct observation of stepwise movement of a synthetic molecular transporter,” Nature nanotechnology, 6(3), 166–169.
- [93] J. List, E. Falgenhauer, E. Kopperger, G. Pardatscher and F. C. Simmel (**2016**); “Long-range movement of large mechanically interlocked DNA nanostructures,” Nature communications, 7, 12414.
- [94] J. Liu, Y. Geng, E. Pound, S. Gyawali, J. R. Ashton, J. Hickey, A. T. Woolley and J. N. Harb (**2011**); “Metallization of branched DNA origami for nanoelectronic circuit fabrication,” ACS nano, 5(3), 2240–2247.
- [95] G. P. Acuna, F. M. Möller, P. Holzmeister, S. Beater, B. Lalkens and P. Tinnefeld (**2012**); “Fluorescence enhancement at docking sites of DNA-directed self-assembled nanoantennas,” Science (New York, N.Y.), 338(6106), 506–510.

- [96] P. Holzmeister, E. Pibiri, J. J. Schmied, T. Sen, G. P. Acuna and P. Tinnefeld (**2014**); “Quantum yield and excitation rate of single molecules close to metallic nanostructures,” Nature communications, 5, 5356.
- [97] F. Kukulka and C. M. Niemeyer (**2004**); “Synthesis of fluorescent oligonucleotide–EYFP conjugate: towards supramolecular construction of semisynthetic biomolecular antennae,” Organic & biomolecular chemistry, 2(15), 2203–2206.
- [98] I. Jusuk (**2013**); “Ortsspezifische Platzierung von Fluoreszenzprotein-DNA-Konjugaten auf DNA-Origamis,” Masterarbeit, TU Braunschweig.
- [99] C. Vietz (**2013**); “Einzelmolekül- und Superauflösungsfluoreszenzmikroskopie mit fluoreszierenden Proteinen auf DNA-Origami Nanostrukturen,” Masterarbeit, TU Braunschweig, betreut durch I. Jusuk.
- [100] S. R. McRae, C. L. Brown and G. R. Bushell (**2005**); “Rapid purification of EGFP, EYFP, and ECFP with high yield and purity,” Protein expression and purification, 41(1), 121–127.
- [101] R. Roy, S. Hohng and T. Ha (**2008**); “A practical guide to single-molecule FRET,” Nature methods, 5(6), 507–516.
- [102] C. Forthmann (**2013**); “Entwicklung und Anwendung von supraauflösender Fluoreszenzmikroskopie,” Dissertation, TU Braunschweig.
- [103] A. Gietl, P. Holzmeister, F. Blombach, S. Schulz, L. V. von Voithenberg, D. C. Lamb, F. Werner, P. Tinnefeld and D. Grohmann (**2014**); “Eukaryotic and archaeal TBP and TFB/TF(II)B follow different promoter DNA bending pathways,” Nucleic acids research, 42(10), 6219–6231.
- [104] C. S. Smith, N. Joseph, B. Rieger and K. A. Lidke (**2010**); “Fast, single-molecule localization that achieves theoretically minimum uncertainty,” Nature methods, 7(5), 373–375.
- [105] A. M. Bogdanov, E. I. Kudryavtseva and K. A. Lukyanov (**2012**); “Anti-fading media for live cell GFP imaging,” PloS one, 7(12), e53004.
- [106] C. M. Winterflood and H. Ewers (**2014**); “Single-molecule localization microscopy using mCherry,” Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry, 15(16), 3447–3451.

- [107] A. M. Bogdanov, E. A. Bogdanova, D. M. Chudakov, T. V. Gorodnicheva, S. Lukyanov and K. A. Lukyanov (**2009**); “Cell culture medium affects GFP photostability: a solution,” Nature methods, 6(12), 859–860.
- [108] I. Jusuk, C. Vietz, M. Raab, T. Dammeyer and P. Tinnefeld (**2015**); “Super-Resolution Imaging Conditions for enhanced Yellow Fluorescent Protein (eYFP) Demonstrated on DNA Origami Nanorulers,” Scientific reports, 5, 14075.
- [109] A. Kirchhofer, J. Helma, K. Schmidthals, C. Frauer, S. Cui, A. Karcher, M. Pellis, S. Muyldermans, C. S. Casas-Delucchi, M. C. Cardoso, H. Leonhardt, K.-P. Hopfner and U. Rothbauer (**2010**); “Modulation of protein properties in living cells using nanobodies,” Nature structural & molecular biology, 17(1), 133–138.
- [110] H.-W. Lee, J. Y. Ryu, J. Yoo, B. Choi, K. Kim and T.-Y. Yoon (**2013**); “Real-time single-molecule coimmunoprecipitation of weak protein-protein interactions,” Nature protocols, 8(10), 2045–2060.
- [111] D. M. Shcherbakova, P. Sengupta, J. Lippincott-Schwartz and V. V. Verkhusha (**2014**); “Photocontrollable fluorescent proteins for superresolution imaging,” Annual review of biophysics, 43, 303–329.
- [112] M. Raab, I. Jusuk, J. Molle, E. Buhr, B. Bodermann, D. Bergmann, H. Bosse and P. Tinnefeld (**2018**); “Using DNA origami nanorulers as traceable distance measurement standards and nanoscopic benchmark structures,” Scientific reports, 8(1), 1780.

## 8 Abkürzungen

Hier sind die benutzten Abkürzungen zusammengefasst:

AS	Ascorbinsäure
BFP/CFP/YFP	engl. blue/cyan/yellow fluorescent protein
COT	Cyclooctatetraen
Cy	Cyanin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
dSTORM	engl. direct stochastic optical reconstruction microscopy
(EM)CCD	engl. electron multiplying charge-coupled device
EYFP	engl. enhanced yellow fluorescent protein
FP	engl. fluorescent proteins bzw. fluoreszierende Proteine
FWHM	engl. full width at half maximum, Halbwerstbreite
GUM	engl. guide to the expression of uncertainty in measurement
IC	engl. internal conversion
ISC	engl. intersystem crossing
LB	lokalisierungsbasiert
ME	$\beta$ -Mercaptoethanol
Nb	engl. nanobody
PAINT	engl. point accumulation for imaging in nanoscale topography
PET	Photoinduzierter Elektronentransfer
PSF	engl. point spread function
ROXS	engl. reducing and oxidizing system
RT	Raumtemperatur
S	Singulett-Zustand
SNR	engl. signal to noise ratio
STED	engl. stimulated emission depletion
T	Triplett-Zustand
TIRF	engl. total internal reflection fluorescence microscopy
TQ	engl. troloxquinone/Troloxchinon
TX	Trolox
TTE	Triplett-Triplett-Energietransfer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	Volumen/Volumen-Prozentanteil
wtGFP	engl. wild type green fluorescent protein
w/w	Masse/Masse-Prozentanteil

## 9 Anhang

Bilder und Tabellen:

Tabelle 9.1: Zusammensetzung eines 15 %-igen SDS-PAGE-Gels

	Sammelgel	Trenngel
H <sub>2</sub> O	2,1 mL	1,1 mL
1M Tris, pH 6,8	0,38 mL	1,3 mL
10% (w/v)SDS	30 $\mu$ L	50 $\mu$ L
30% PAA	0,5 mL	2,5 mL
10% (w/v) APS	30 $\mu$ L	50 $\mu$ L
TEMED	3 $\mu$ L	5 $\mu$ L



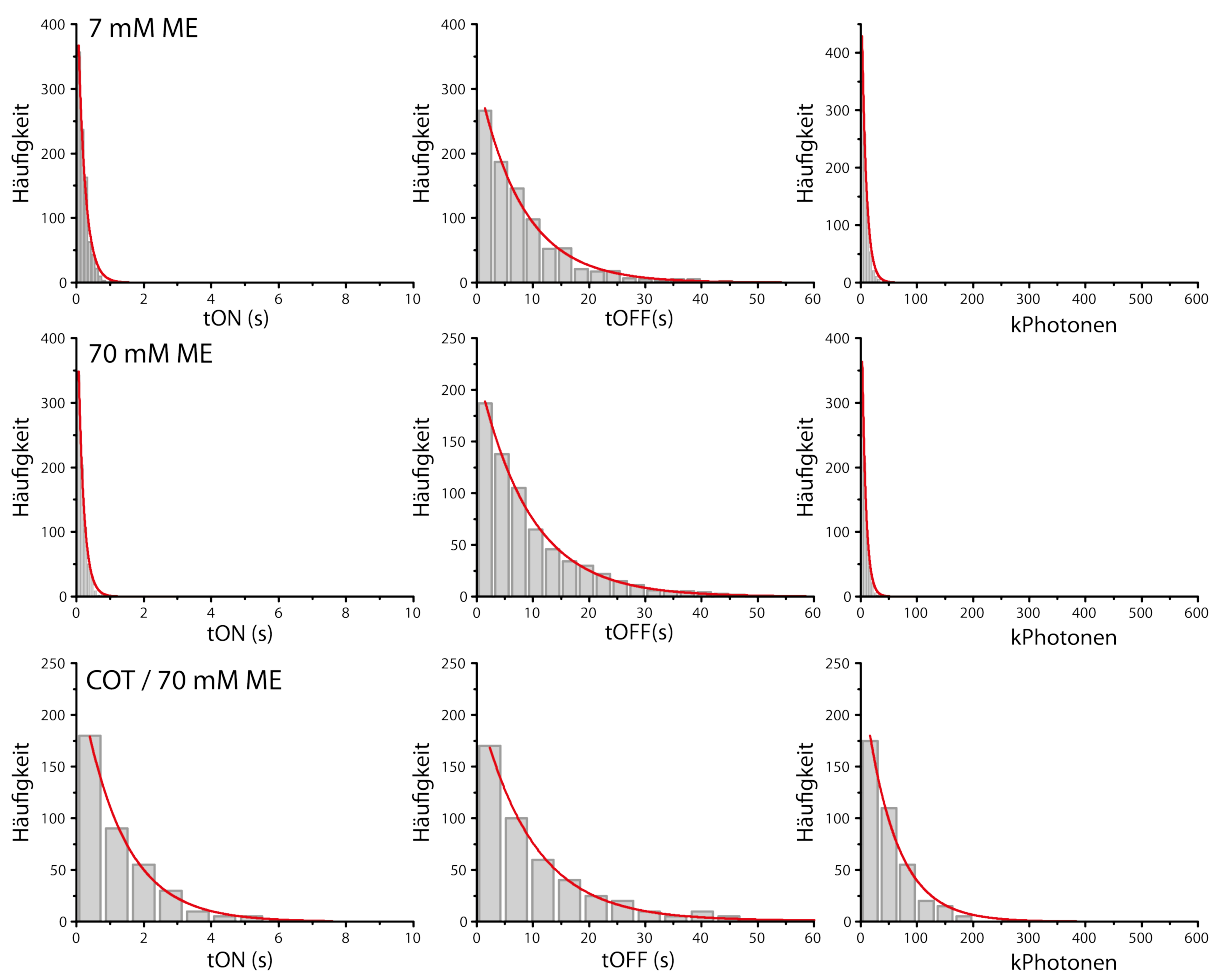


Abbildung 9.1: a. Histogramme von Alexa647-Kinetikdaten: Dauer der Auszustände (tOFF), der Anzustände (tON) und Photonenzahl pro Anzustand mit entsprechenden monoexponentiellen Anpassungen mit jeweils unterschiedlichen chemischen Zusammensetzungen (dSTORM 7 mM und 70 mM ME, COT/dSTORM 70 mM ME).

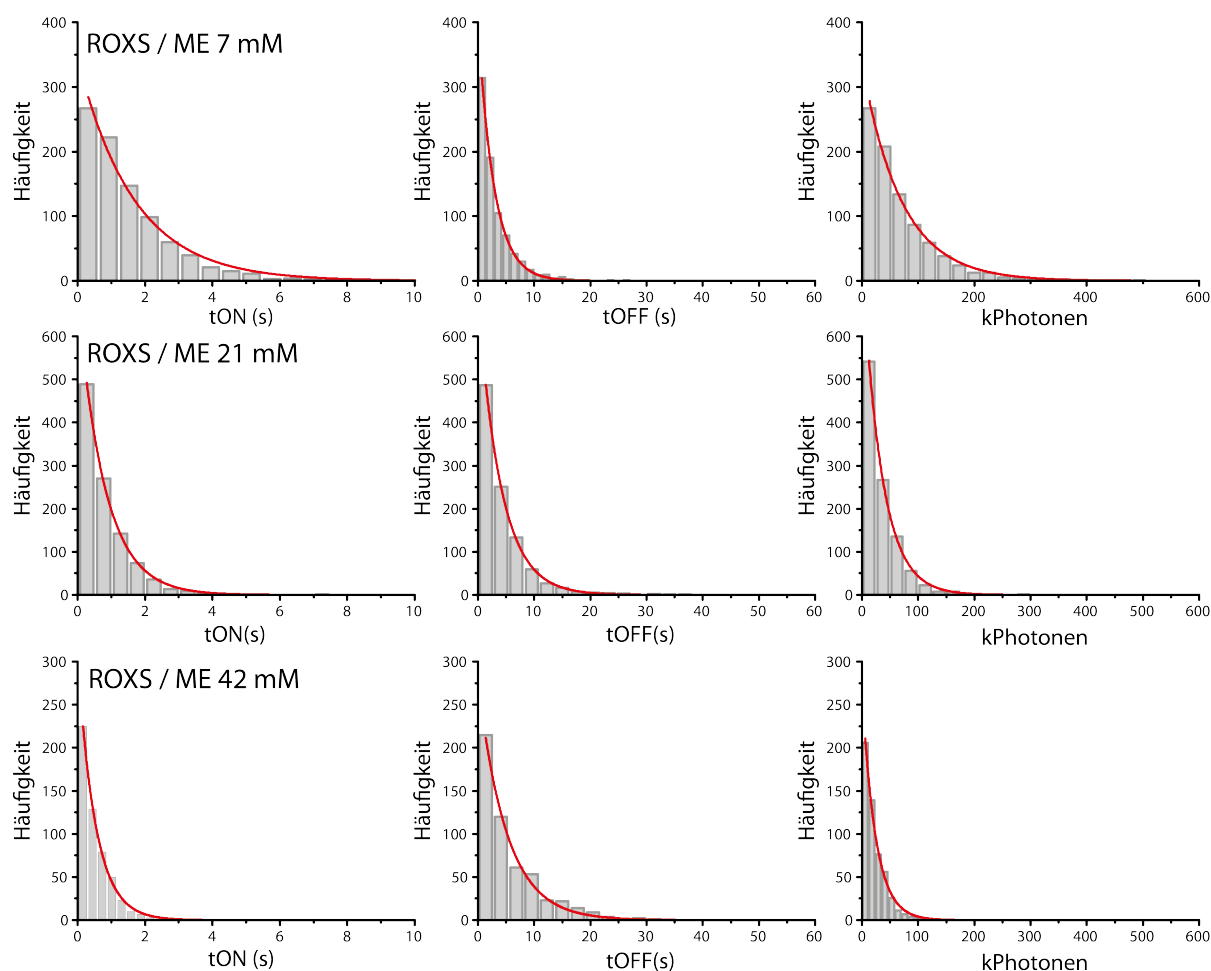


Abbildung 9.2: b. Histogramme von Alexa647-Kinetikdaten: Dauer der Auszustände ( $t_{\text{OFF}}$ ), der Anzustände ( $t_{\text{ON}}$ ) und Photonenzahl pro Anzustand mit entsprechenden monoexponentiellen Anpassungen mit jeweils unterschiedlichen chemischen Zusammensetzungen (ROXS/dSTORM 7 bis 42 mM ME).

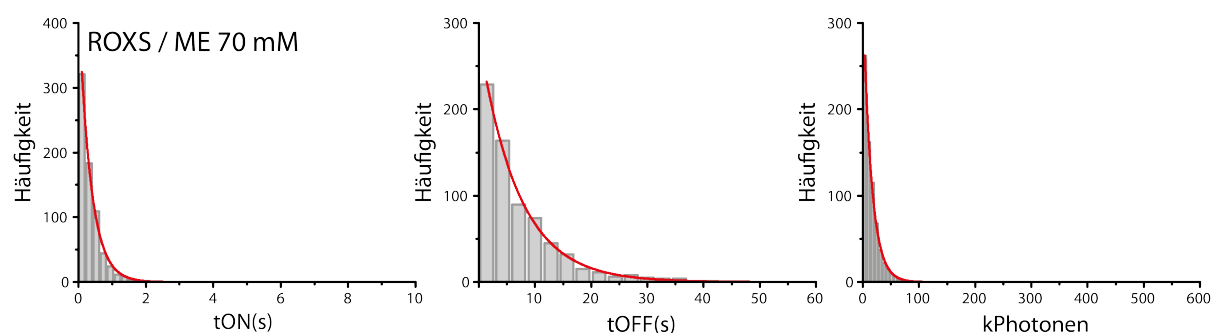


Abbildung 9.3: c. Histogramme von Alexa647-Kinetikdaten: Dauer der Auszustände ( $t_{\text{OFF}}$ ), der Anzustände ( $t_{\text{ON}}$ ) und Photonenzahl pro Anzustand mit entsprechenden monoexponentiellen Anpassungen mit jeweils unterschiedlichen chemischen Zusammensetzungen (ROXS/dSTORM 70 mM ME).

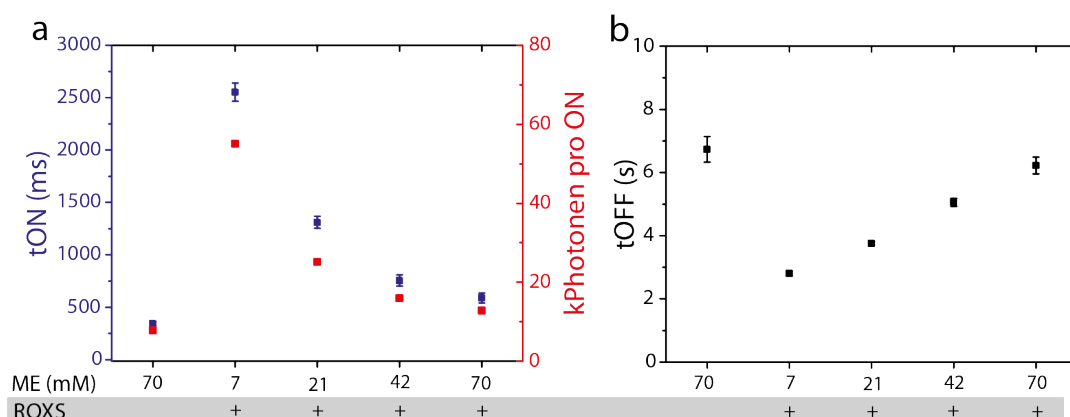


Abbildung 9.4: (a-b) Kinetikdaten von Cy5 aufgenommen an einem TIRF-Mikroskop unter Verwendung von dSTORM 70 mM ME und ROXS/dSTORM 7 bis 70 mM ME: mittlere Dauer der Anzustände ( $t_{ON}$ ), mittlere Photonenzahl pro Anzustand, mittlere Dauer der Auszustände ( $t_{OFF}$ ). Dargestellte Fehlerbalken sind Fitfehler aus monoexponentiellen Anpassungen von Histogrammen der präsentierten Kinetikdaten, die jeweils von über 150 einzelnen Farbstoffmolekülen stammen.

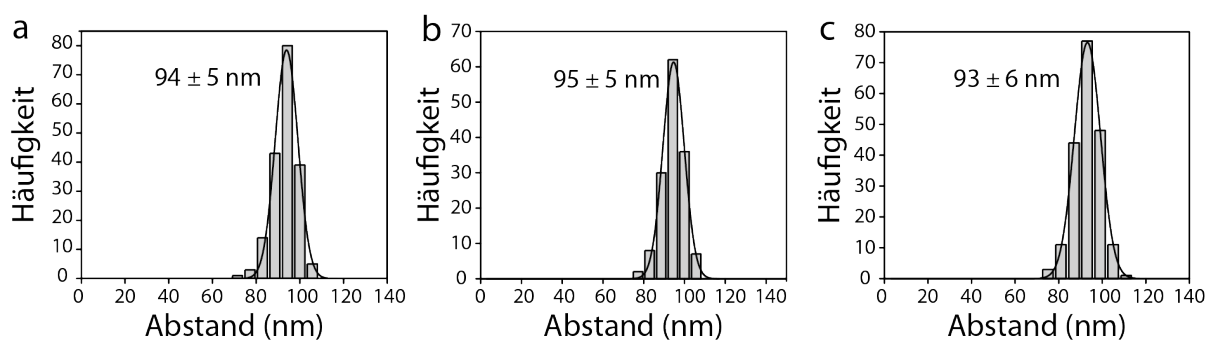


Abbildung 9.5: Superauflösungsmessungen von Alexa647-fluoreszenzmarkierten rechteckigen DNA-Origami-Strukturen, präsentiert in Abbildung 5.7. Abstandshistogramme mit entsprechenden Gauß-Fits für unterschiedliche Pufferzusammensetzungen: dSTORM (a), COT/dSTORM (b), ROXS/dSTORM (c). Standardabweichungen der verwendeten Gauß-Fits wurden für die Fehlerangabe verwendet.

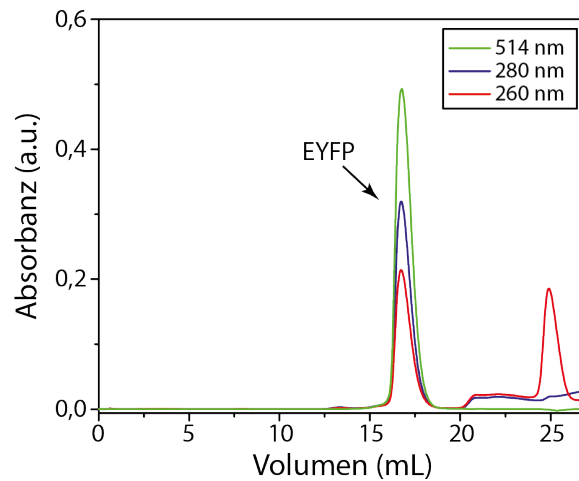


Abbildung 9.6: Superdex-Gelfiltrationschromatographie von EYFP mit einer zusätzlichen Cysteingruppe am C-Ende nach der Aktivierung mit DTT.

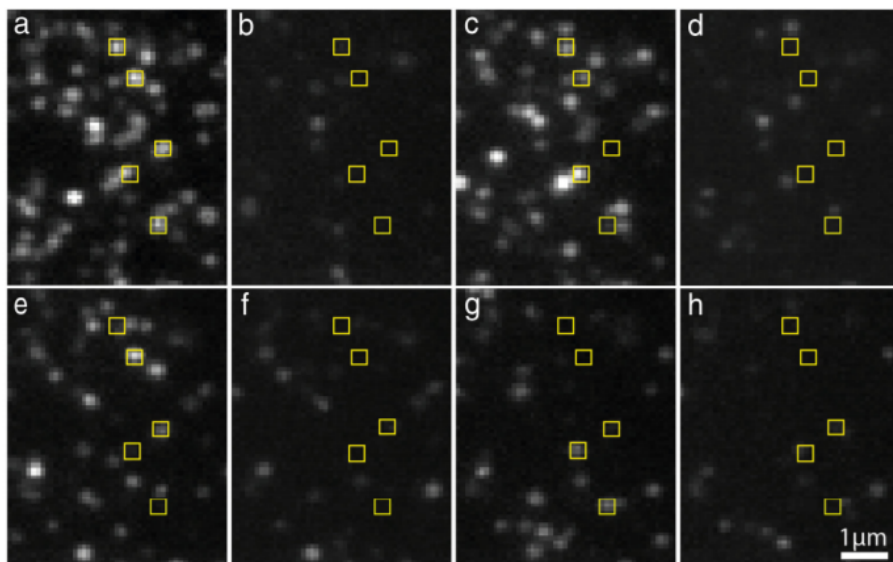


Abbildung 9.7: Demonstration von UV-Photoreaktivierung von EYFPs, die an 12-Helixbündel-DNA-Origami-Strukturen in einem Abstand von 100 nm immobilisiert wurden (s. Abbildung 5.16 e). Die Messungen wurden unter alternierender Anregung mit 488 nm ca. ( $80 \text{ W cm}^{-2}$ ) und Reaktivierung mit 405 nm ( $500 \text{ W cm}^{-2}$ ) im Tris-Puffer durchgeführt. Jedes der dargestellten Bilder entstand durch Aufsummierung von 60 aufeinanderfolgender TIRF-Bilder vor (a, b, d, f, h) und nach UV-Reaktivierung (c, e, g). EYFP-Moleküle konnten maximal bis zu zweimal durch UV reaktiviert werden.

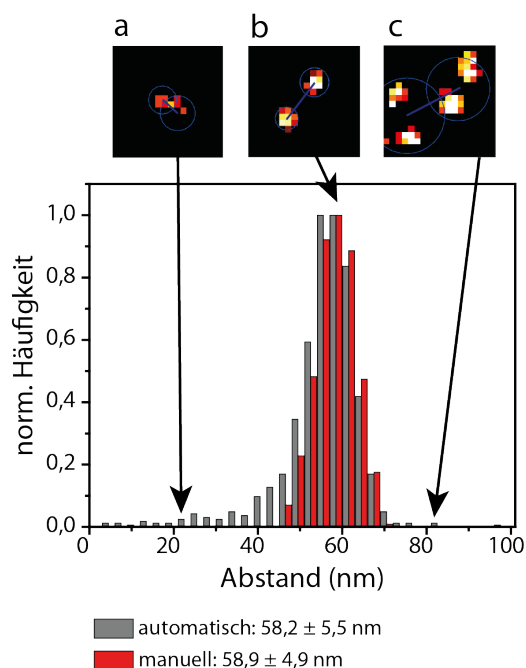


Abbildung 9.8: Abstandshistogramme (ausgewertet nach Gleichung 4.5, s. Material und Methoden mit  $P = 101 \pm 0,5$  nm) von supraaufgelösten Strukturen, die als solche durch den automatischen Auswertungsalgorithmus mit (rot) und ohne (grau) nachträglicher manueller Auslese der Strukturen identifiziert wurden. Ohne manuelle Auslese würden neben den korrekten Strukturen (b) die berechneten Abstände der falsch erkannten Doppelpot-Strukturen (a, c) ins Gewicht fallen. Fehler sind hier als Standardabweichung der Gauß-Fitfunktionen angegeben.

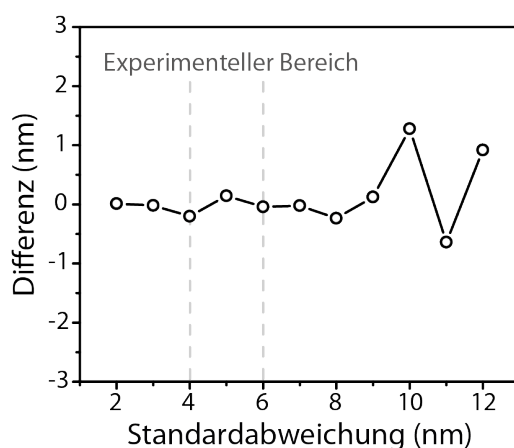


Abbildung 9.9: Differenz zwischen dem Abstands-Sollwert (30 nm) und dem mittleren Abstand aus der Auswertung (s. Gleichung 4.5) simulierter Doppelpot-Strukturen unter Variation der Standardabweichungen der Lokalisierungswolken (von 0 nm bis 12 nm). Eingezeichnet ist der Bereich der Standardabweichungen, die auf experimentell gewonnen Ergebnissen beruhen (s. Abbildung 5.19).

Tabelle 9.2: Bedingungen für Monte-Carlo-Simulationen der Doppelspots unter Benutzung angegebener Standardabweichung der Probeneigenschaften diente zum Abschätzen der Unsicherheit infolge struktureller Schwankungen ( $u(d_j)$ ). Die Standardabweichung der simulierten Abstände variierte von 0 nm bis 5 nm.

Eigenschaft	Wert	Standardabweichung
Abstand (nm)	30	0 bis 5 nm
# Photonen	18000	3000
# Lokalisierungen/Farbstoff	19	6
# Farbstoff/Markierung	9	0
Markierungseffizienz (%)	77	28
tON/tOFF	0,02	0

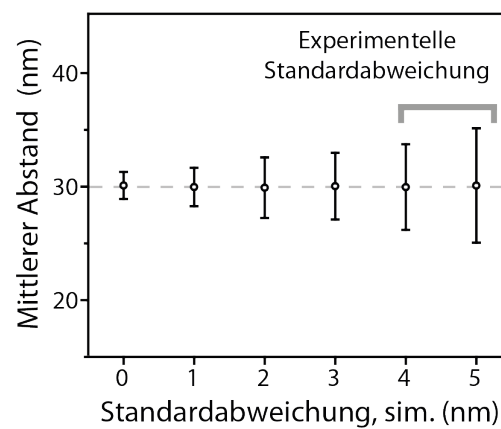


Abbildung 9.10: Ergebnisse von Monte-Carlo-Simulationen von Abständen unter den Bedingungen aus Tabelle 9.2, gestrichelte Linie stellt den mittleren simulierten Abstand dar.

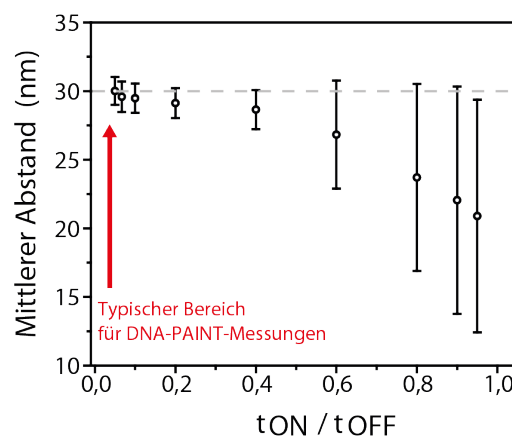


Abbildung 9.11: Einfluss der Blinkkinetik auf die Messunsicherheit, abgeschätzt durch Monte-Carlo-Simulationen ( $d_{sim} = 30$  nm, gestrichelt).

## DNA-Sequenzen:

(A)

Biotin-modifizierte DNA-Stränge für rechteckige DNA-Origami-Strukturen, markiert mit Alexa647 (s. Kapitel Kombination eines Redoxsystems (ROXS) mit dSTORM):

Sequenz 5' - 3'
Biotin-AGCCACCACTGTAGCGCGTTTTCAAGGGAGGGAAGGTAAA
Biotin-CGGATTCTGACGACAGTATCGGCCGCAAGGCGATTAAGTT
Biotin-TAGAGAGTTATTTTCATTTGGGGATAGTAGCATTAA
Biotin-ATAAGGGAACCGGATATTCATTACGTCAGGACGTTGGGAA
Biotin-GAGAAGAGATAACCTTGCTTCTGTTTCGGGAGAAACAATAA
Biotin-GAAACGATAGAAGGCTTATCCGGTCTCATCGAGAACAAGC

DNA-Ankerstränge für rechteckige DNA-Origami-Strukturen, markiert mit Alexa647 (s. Kapitel Kombination eines Redoxsystems (ROXS) mit dSTORM):

Sequenz 5' - 3'
GCCGTCAAAAAACAGAGGTGAGGCCTATTAGTTTTTCCTCTACCACCTACATCACAA
ACGGCTACAAAAGGAGCCTTTAATGTGAGAATTTTTTCCTCTACCACCTACATCACAA
ACAACCTTTCAACAGTTTCAGCGGATGTATCGGTTTTTCCTCTACCACCTACATCACAA
CTTTAATGCGCGAACTGATAGCCCCACCAGTTTTTCCTCTACCACCTACATCACAA
GCACAGACAATATTTTTGAATGGGGTCAGTATTTTTTCCTCTACCACCTACATCACAA
AGAAAGGAACAACCTAAAGGAATTCAAAAAATTTTTTCCTCTACCACCTACATCACAA

Unmodifizierte DNA-Sequenzen für rechteckige DNA-Origami-Strukturen, markiert mit Alexa647 (s. Kapitel Kombination eines Redoxsystems (ROXS) mit dSTORM):

Sequenz 5' - 3'
TCAATATCGAACCTCAAATATCAATTCCGAAA
GCGAACCTCCAAGAACGGGTATGACAATAA
TGCATCTTTCCCAGTCACGACGGCCTGCAG
ATACATACCGAGGAAACGCAATAAGAAGCGCATTAGACGG
GCTATCAGAAATGCAATGCCTGAATTAGCA
TACGTTAAAGTAATCTTGACAAGAACCGAACT
GACAAAAGGTAAAGTAATCGCCATATTTAACAAAACCTTTT
AATTGAGAATTCTGTCCAGACGACTAAACCAA
CCAACAGGAGCGAACCAGACCGGAGCCTTTAC
TGACAACTCGCTGAGGCTTGCAATTATACCA
GATGGTTTGAACGAGTAGTAAATTTACCATTA

TGAAAGGAGCAAATGAAAAATCTAGAGATAGA
ATTATCATTCAATATAATCCTGACAATTAC
GCCCTTCAGAGTCCACTATTAAAGGGTGCCGT
AAAGGCCGGAGACAGCTAGCTGATAAATTAATTTTGT
TAATCAGCGGATTGACCGTAATCGTAACCG
ACCGATTGTCGGCATTTCGGTCATAATCA
GCTTCCGATTACGCCAGCTGGCGGCTGTTTC
TCATCGCCAACAAAGTACAACGGACGCCAGCA
TCGGCAAATCCTGTTTGATGGTGGACCCCTCAA
TAAGAGCAAATGTTTAGACTGGATAGGAAGCC
AGTATAAAGTTCAGCTAATGCAGATGTCTTTC
AACAAGAGGGATAAAAATTTTAGCATAAAGC
CAGCAAAAGGAAACGTCACCAATGAGCCGC
GCGGATAACCTATTATTCTGAAACAGACGATT
CTGAGCAAAAATTAATTACATTTTGGGTTA
CGGATTGCAGAGCTTAATTGCTGAAACGAGTA
ACCCTTCTGACCTGAAAGCGTAAGACGCTGAG
TTTTATTTAAGCAAATCAGATATTTTTGT
AAGCCTGGTACGAGCCGGAAGCATAGATGATG
ATCGCAAGTATGTAAATGCTGATGATAGGAAC
GCCTCCCTCAGAATGGAAAGCGCAGTAACAGT
AAAGCACTAAATCGGAACCCTAATCCAGTT
TTAGTATCACAATAGATAAGTCCACGAGCA
AAATCACCTTCCAGTAAGCGTCAGTAATAA
AACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAACCAGTAA
TATAACTAACAAAGAACGCGAGAACGCCAA
GATGGCTTATCAAAAAGATTAAGAGCGTCC
CTGTAGCTTGACTATTATAGTCAGTTCATTGA
CTTTAGGGCCTGCAACAGTGCCAATACGTG
GATTTAGTCAATAAAGCCTCAGAGAACCCTCA
AACGCAAAGATAGCCGAACAAACCCTGAAC
CACCAGAAAGGTTGAGGCAGGTCATGAAAG
ATATTTTGGCTTTCATCAACATTATCCAGCCA,
ACAAACGGAAAAGCCCCAAAAACACTGGAGCA
AAGGAAACATAAAGGTGGCAACATTATCACCG
TCATTAGATGCGATTTTAAGAACAGGCATAG
CCTAAATCAAATCATAGGTCTAAACAGTA
TTAATGAACTAGAGGATCCCCGGGGGGTAACG
TTTTCACTCAAAGGGCGAAAAACCATCACC
CTTTTGCAGATAAAAACCAAATAAAGACTCC
ACGCTAACACCCACAAGAATTGAAAATAGC
GGCCTTGAAGAGCCACCACCCTCAGAAACCAT
CATAAATCTTTGAATACCAAGTGTTAGAAC
AAAGTCACAAAATAAACAGCCAGCGTTTTA
TCAAGTTTCATTAAAGGTGAATATAAAAGA



TATTAAGAAGCGGGGTTTTGCTCGTAGCAT
CCTGATTGCAATATATGTGAGTGATCAATAGT
CTTATCATTTCCCGACTTGCGGGAGCCTAATTT
CGAAAGACTTTGATAAGAGGTCATATTTTCGCA
TCCTTCGCTGCACCGCTTCTGGTGCGGCCTTCC
TTATACCACCAAATCAACGTAACGAACGAG
CAGCGAAACTTGCTTTCGAGGTGTTGCTAA
TCAAATATAACCTCCGGCTTAGGTAACAATTT
ATTATACTAAGAAACCACCAGAAGTCAACAGT
ATTTTAAATCAAAATTATTTGCACGGATTTCG
TAAATCATATAACCTGTTTAGCTAACCTTTAA
TCCACAGACAGCCCTCATAGTTAGCGTAACGA
CAAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAAACGTGGA
AATACTGCCCAAAGGAATTACGTGGCTCA
CGTAAACAGAAATAAAAATCCTTTGCCCGAAAGATTAGA
TTGCTCCTTTCAAATATCGCGTTTGAGGGGGT
CAGAAGATTAGATAATACATTTGTCGACAA
TTTAGGACAAATGCTTTAAACAATCAGGTC
GCAAGGCCTCACCAGTAGCACCATGGGCTTGA
ATATTCGGAACCATCGCCACGCAGAGAAGGA
TTGACAGGCCACCACCAGAGCCGCGATTGTGA
AGACGACAAAGAAGTTTTGCCATAATTCGAGCTTCAA
GTGCGACTTCGGCCAACGCGCGGGGTTTTTC
GCCATCAAGCTCATTTTTTAACCACAAATCCA
TTCTACTACGCGAGCTGAAAAGGTTACCGCGC
GCGCAGACAAGAGGCAAAAAGAATCCCTCAG
GACCTGCTCTTTGACCCCCAGCGAGGGAGTTA
TTATTACGAAGAACTGGCATGATTGCGAGAGG
GAGGGTAGGATTCAAAAGGGTGAGACATCCAA
CTTAGATTTAAGGCGTTAAATAAAGCCTGT
CTGTGTGATTGCGTTGCGCTCACTAGAGTTGC
GCAATTCACATATTCCTGATTATCAAAGTGTA
TTTATCAGGACAGCATCGGAACGACACCAACCTAAAACGA
TGGAACAACCGCCTGGCCCTGAGGCCCGCT
CACAACAGGTGCCTAATGAGTGCCCAGCAG
AATGGTCAACAGGCAAGGCAAAGAGTAATGTG
AATAGCTATCAATAGAAAATTCAACATTCA
GATGTGCTTCAGGAAGATCGCACAAATGTGA
AGCCAGCAATTGAGGAAGGTTATCATCATTTT
AGCGCGATGATAAATTGTGTCGTGACGAGA
AGAAAACAAAGAAGATGATGAAACAGGCTGCG
CAACTGTTGCGCCATTTCGCCATTCAAACATCA
ATACCCAACAGTATGTTAGCAAATTAGAGC
TTTCGGAAGTGCCGTCGAGAGGGTGAGTTTCG
ACAACATGCCAACGCTCAACAGTCTTCTGA

GCGAAAAATCCCTTATAAATCAAGCCGGCG
GACCAACTAATGCCACTACGAAGGGGGTAGCA
CTCGTATTAGAAATTGCGTAGATACAGTAC
TGTAGAAATCAAGATTAGTTGCTCTTACCA
CCCATTAGAGCTTGACGGGGAAAAAGAATA
TTAAAGCCAGAGCCGCCACCCTCGACAGAA
CTTTTACAAAATCGTCGCTATTAGCGATAG
TTAGGATTGGCTGAGACTCCTCAATAACCGAT
CAACCGTTTCAAATCACCATCAATTCGAGCCA
AGGCTCCAGAGGCTTTGAGGACACGGGTAA
AATACGTTTGAAAGAGGACAGACTGACCTT
GTTTATCAATATGCGTTATACAAACCGACCGTGTGATAAA
TATATTTTGTCAATTGCCTGAGAGTGGAAGATTGTATAAGC
TAAATCAAAATAATTTCGCGTCTCGGAAACC
AAACAGCTTTTTTGCGGGATCGTCAACACTAAA
TGTAGCCATTAAAATTCGCATTAAATGCCGGA
GAGAGATAGAGCGTCTTTCCAGAGGTTTGTAA
AGGCAAAGGGAAGGGCGATCGGCAATTCCA
TAGGTAAACTATTTTTGAGAGATCAAACGTTA
TAAATCGGGATTCCCAATTCTGCGATATAATG
CGCGCAGATTACCTTTTTTAATGGGAGAGACT
GAAATTATTGCCTTTAGCGTCAGACCGGAACC
TTTACCCCAACATGTTTTAAATTTCCATAT
TTCCAGTCGTAATCATGGTCATAAAAGGGG
ATGCAGATACATAACGGGAATCGTCATAAATAAGCAAAG
AGGAACCCATGTACCGTAACACTTGATATAA
CAGGAGGTGGGGTCAGTGCCTTGAGTCTCTGAATTTACCG
AATAGTAAACACTATCATAACCCTCATTGTGA
AGAGAGAAAAAATGAAAATAGCAAGCAAAC
GCGAGTAAAAATATTTAAATTGTTACAAAG
TCTAAAGTTTTGTCGTCTTCCAGCCGACAA
TAAAAGGGACATTCTGGCCAACAAAGCATC
AACAGTTTTGTACCAAAAACATTTTATTTT
CACATTAAAATTGTTATCCGCTCATGCGGGCC
ACACTCATCCATGTTACTTAGCCGAAAGCTGC
AAGGCCGCTGATACCGATAGTTGCGACGTTAG
CTACCATAGTTTGAGTAACATTTAAAATAT
GCCTTAAACCAATCAATAATCGGCACGCGCCT
14[175],12[176],CATGTAATAGAATATAAAGTACCAAGCCGT
22[175],20[176],ACCTTGCTTGGTCAGTTGGCAAAGAGCGGA
19[56],21[63],TACCGAGCTCGAATTCGGGAAACCTGTCGTGCAGCTGATT
GTTTTAACTTAGTACCGCCACCCAGAGCCA
TCACCGACGCACCGTAATCAGTAGCAGAACCG
GCGGAACATCTGAATAATGGAAGGTACAAAAT
ATTACCTTTGAATAAGGCTTGCCCAAATCCGC

CTCCAACGCAGTGAGACGGGCAACCAGCTGCA
ACCTTTTTATTTTAGTTAATTTTCATAGGGCTT
AAGTAAGCAGACACCACGGAATAATATTGACG
CCAGGGTTGCCAGTTTGAGGGGACCCGTGGGA
GCCCGTATCCGGAATAGGTGTATCAGCCCAAT
T TAACGTCTAACATAAAAAACAGGTAACGGA
CCACCCTCATTTTCAGGGATAGCAACCGTACT
GCCCGAGAGTCCACGCTGGTTTGCAGCTAACT
ATCCCAATGAGAATTAACCTGAACAGTTACCAG
AACGCAAAATCGATGAACGGTACCGGTTGA
GTTTATTTTGTGACAACTCTTACCGAAGCCCTTTAATATCA
CCAATAGCTCATCGTAGGAATCATGGCATCAA
CATCAAGTAAAACGAACTAACGAGTTGAGA
TCACCAGTACAACTACAACGCCTAGTACCAG
GTACCGCAATTCTAAGAACGCGAGTATTATTT
TTAACACCAGCACTAACAATAATCGTTATTA
CATTTGAAGGCGAATTATTCATTTTGTGTTGG
GTAATAAGTTAGGCAGAGGCATTTATGATATT
GTATAGCAAACAGTTAATGCCCAATCCTCA
GCCAGTTAGAGGGTAATTGAGCGCTTTAAGAA
AGCAAGCGTAGGGTTGAGTGTTGTAGGGAGCC
AAATTAAGTTGACCATTAGATACTTTTGCG
ATCCCCCTATACCACATTCAACTAGAAAAATC
AACACCAAATTTCAACTTTAATCGTTTACC
TAAATGAATTTTCTGTATGGGATTAATTTCTT
GAATTTATTTAATGGTTTGAAATATTCTTACC
CGATAGCATTGAGCCATTTGGGAACGTAGAAA
CCACCCTCTATTCACAAACAAATACCTGCCTA

**(B)**

Modifizierte DNA-Stränge für 12-Helixbündel-DNA-Origami-Strukturen (s. Kapitel Optimierung der photophysikalischen Eigenschaften von EYFP):

Sequenz 5' - 3'	Modification
GTACATCGACATCGTTAACGGCA	5'-TTTTTT-biotin
AAGAAACAATGACCGGAAACGTC	5'-TTTTTT-biotin
AACGCCAAAAGGCGGATGGCTTA	5'-TTTTTT-biotin
ATACCACCATCAGTGAGGCCAAACCGTTGTAGCAA	3'-TTTTTT-biotin
GTTTGATGGTGGTTCAGAACCCCGCCTCACAGAAT	5'-TTT-Atto647N

DNA-Ankerstränge für 12-Helixbündel-DNA-Origami-Strukturen: EYFP mit Atto647N (1), 100 nm (2), 160 nm (3), 2-Farben-Superauflösungsmikroskopie mit EYFP und Alexa647 (4) (s. Kapitel Optimierung der photophysikalischen Eigenschaften von EYFP):

Sequenz 5' - 3'	
GTATTAGAGCCGTCAATAGATAAATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	1
AAAAGGGCGACAATTATTTATCCATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	2
AAAAGATAGGGTTGAGTGTATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	2
GCCCCGAGTTTTCATCGGCATATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	2
ATTATTGTTAGCGATTAAGACTCCTTATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	2
AGGGACAAAATCTTCCAGCGCCAAAGACATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	2
ATTCAAGGGGAAGGTAAATGTGGCAAATAAATCATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	2
AGAACGTAGAGCCTTAAAGGTGAATTAATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	2
GAATTGTAGCCAGAATGGATCAGAGCAAATCCTATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	2
AGCGCCACCACGGAATACGCCTCAGACCAGAGCCACCACCATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	2
TCACCGTCACCGGCGCAGTCTCTATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	2
AGACGGGAGAATTGACGGAATATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	2
ATTAAAATAAGTGCGACGATTGGCCTTGATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	2
CCTCCGAAATCGGCAAAATATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	2
ATATTCACAAACAAATTCATATGATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	2
TGTTCCAACGCTAACGAACAAGTCAGCAGGGAAGCGCATTATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	2
AAAACGGAATACCCAAAAGAACTATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	2
AGAGTTTATACCAGTAGCACCTGAAACCATCGATAATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	2
ACCAATTACCAGGTCATA	2
AAGCACAGAGCCTA	2
CCCTTCATATAAA	2
CGAGTAACAACCGTTTACCAGTCATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	3,4

CATCAGCGTCTGGCCTTCCACAGGAACCTGGGGATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	3,4
GATAAAAATTTTTAGCCAGCTTTATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	3,4
CCGGAAGACGTACAGCGCCGCGATTACAATTCCATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	3,4
GGGCCGGAAGCATAAAGTGATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	3,4
CAGCTAACTCACATTAATATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	3,4
TAAAGGATTGTATAAGCGCACAAACGACATTAAATGTGAGATATTTTCCTCTACCACCTAC ATCAC	3,4
TGCGTACTAATAGTAGTTGAAATGCATATTTCAACGCAAGATATTTTCCTCTACCACCTAC ATCAC	3,4
TTCGCGGATTGATTGCTCATTTTTTAAACATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	3,4
GCGAAAGACGCAAAGCCGCCACGGGAACATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	3,4
CAATAGGAACGCAAATTAAGCAAATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	3,4
GGATAACCTCACATTTTTTGTAAATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	3,4
CGTAAAGGTCACGAAACCAGGCAATAGCACCGCTTCTGGTATATTTTCCTCTACCACCTAC ATCAC	3,4
GAAAGATCGCACTCCAGCCAGCTATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	3,4
TTCCGAATTGTAAACGTGTCGCCAGCATCGGTGCGGGCCTATATTTTCCTCTACCACCTAC ATCAC	3,4
GCTAATGCCGGAGAGGGTAGCTAATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	3,4
TTTTTATCCAATAAATCTCTACCCCGGTAAAACTAGCATGATATTTTCCTCTACCACCTACA TCAC	3,4
TCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	3,4
TTAACAAGAGAATCGATGAACGGATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	3,4
TTCTGGAATAATCCTGATTTTGGCCGGCCGTAAATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	2,3,4
AAGATAAAACAGTTGGATTATACATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	2,3,4
CCGAACCCCTAAAACATCGACCAGTTTAGAGCATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	2,3,4
GATTTTAGACAGGCATTAATAAATAATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	2,3,4
TGGCAAGTTTTTTGGGGTCATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	2,3,4
AACACCCTAAAGGGAGCCCATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	2,3,4
CCGATAATAAAAGGGACTTAACACCGCGAACCACCAGCAGATATTTTCCTCTACCACCTAC ATCAC	2,3,4
TCAATAATAAAGTGTATCATCATATTCCATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	2,3,4
GATAGTGCAACATGATATTTTGAATGGATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	2,3,4
TGATTATCAGATATACGTGGCACATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	2,3,4
CTATTAGTCTTTTCGCCGCTACAGATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	2,3,4
GCATCGAGCCAGATATCTTTAGGACCTGAGGAAGGTTATCATATTTTCCTCTACCACCTAC ATCAC	2,3,4
ATTTGGCAAATCAACAGTTGAAAATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	2,3,4
GGAATAACAGAGATAGACATACAACTTGAGGATTTAGAAATATTTTCCTCTACCACCTAC ATCAC	2,3,4
TAAGTAGAAGAACTCAAACTATCGATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	2,3,4
GCCTTACGCTGCGCGTAAATTTATTTTTGACGCTCAATCATATTTTCCTCTACCACCTAC ATCAC	2,3,4
GTTGAAACAAACATCAAGAAAACATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	2,3,4
GTATTAGAGCCGTCAATAGATAAATATTTTCCTCTACCACCTACATCAC	2,3,4

TTGAAGCCCTTTTAAAGAAAAGTATATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	4
TCCCATCCTAATGAGAATAACATATA(T)	4
TTTTTTGTTTAATAAAAGTAATTCATA(T)	4
AAATCAGCCAGTAATAACACTATTTTTGAAGCCTTAAATCATA(T) <sup>25</sup>	4
TAAGCCAGAGAGCCAGAAGGAACTCGATAGCCGAACAAAATA(T) <sup>25</sup>	4
AAAAGATAGGGTTGAGTGTATA(T)	4
AAAACGGAATACCCAAAAGAACTATA(T)	4
AAATAGGTAATTTACAAATAAGAAACGAATA(T)	4
CTCCAATTTAGGCAGAGACAATCAATCAAGAAAAATAATAATA(T)	4
AAAAAAGGCAGCCTTTACAATCTTACCAGTTTGATA(T)	4
CAGTCCTTGATTTTAAGAACTCAACGTTGCGTATATA(T)	4
AACTTTAATCATGGGTAGCAACGATA(T)	4
TGCAACACTATCATAACCCTCGTATA(T)	4
AAAACGAAAGAGGCTCATTATACATA(T)	4
TATGCATTACAGAGGATGGTTTAATTCATA(T)	4
AGACGTCGTCACCCTCAGATCTTGACGCTGGCTGACCTTCATA(T)	4
GTGAGTTAAAGGCCGCTGACACTCATGAAGGCACCAACCTATA(T)	4
ATTTTGCCAGAGGGGGTAATAGTATA(T)	4
TCAACATCAGTTAAATAGCGAGAGTGAGACGACGATAAAAAATA(T)	4
AATAACGCGCGGGGAGAGGATA(T)	4

Unmodifizierte DNA-Sequenzen für 12-Helixbündel-DNA-Origami-Strukturen: EYFP mit Atto647N (1), Superauflösungsmikroskopie 100 nm (2), 160 nm (3) und 2-Farben-Superauflösungsmikroskopie mit EYFP und Alexa647 (4) (s. Kapitel Optimierung der photophysikalischen Eigenschaften von EYFP):

Sequenz 5' - 3'	
GAATTGTAGCCAGAATGGATCAGAGCAAATCCT	1,3,4
CGAGTAACAACCGTTTACCAGTC	1,2
CATCAGCGTCTGGCCTTCCACAGGAACCTGGGG	1,2
GATAAAAATTTTTAGCCAGCTTT	1,2
GCCTTATACCCTGTAATACCAATTCTTGCGCTC	1,2,3,4
GACCGGAAGCAATTGCGGGAGAA	1,2,3,4
CGAGCACAGACTTCAAATACCTCAAAAGCTGCA	1,2,3,4
AAAAATCTACGTGCGTTTTAATT	1,2,3,4
CAGTCCTTGATTTTAAGAACTCAACGTTGCGTAT	1,2,3
AAAACGAAAGAGGCTCATTATAC	1,2,3
ACTACCTTTAAACGGGTAACAGGGAGACGGGCA	1,2,3,4
TTGTCGTCTTTCTACGTAATGCC	1,2,3,4
AGCGTATCATTCCACAGACCCGCCACAGTTGCAGCAAGCG	1,2,3,4
GCGTCATACATGCCCTCATAGTT	1,2,3,4
TCACCGTCACCGGCGCAGTCTCT	1,3,4
ATTCAAGGGGAAGGTAAATGTGGCAAATAAATC	1,3,4
AGACGGGAGAATTGACGGAAATT	1,3,4

AAAAAAGGCAGCCTTTACAATCTTACCAGTTTG	1,2,3
TCCCATCCTAATGAGAATAACAT	1,2,3
CTGAAAACCTGTTTATCAAACATGTAACGTCAA	1,2,3,4
CGGTAGTACTCAATCCGCTGCTGGTCATGGTC	1,2,3,4
TTAGGTTGGGTATATAGATAAGTC	1,2,3,4
TACCTAATATCAAAATCATTCAATATTACGTGA	1,2,3,4
TAGAACCTACCAGTCTGAGAGAC	1,2,3,4
TTCTGGAATAATCCTGATTTTGCCCGGCCGTAA	1
AAGATAAAACAGTTGGATTATAC	1
CCGAACCCCTAAAACATCGACCAGTTTAGAGC	1
GATTTTAGACAGGCATTAAAAATA	1
GACTTCTCCGTGGCGCGGTTG	1,2,3,4
CCGGAAGACGTACAGCGCCGCGATTACAATTCC	1,2
GGGCCGGAAGCATAAAGTG	1,2
TCAGCTAACTCACATTAAT	1,2
AGCAGTCGGGAAACCTGTC	1,2,3,4
AATAACGCGCGGGGAGAGG	1,2,3
GATGTTTTTCTTTTCACCA	1,2,3,4
TCGTCACCGCCTGGCCCT	1,2,3,4
TACCTGGTTTGCCCCAGCA	1,2,3,4
CCTCCGAAATCGGCAAAAT	1,3,4
AAAAGATAGGGTTGAGTGT	1,3
CTATATTAAAGAACGTGGA	1,2,3,4
CATTCTATCAGGGCGATGG	1,2,3,4
TGGCAAGTTTTTTGGGGTC	1
AACACCCTAAAGGGAGCCC	1
AGACGGCGAACGTGGCGAG	1,2,3,4
GTATGTGAAATTGTTATCC	1,2,3,4
ACACAACATACGAGGGATGTGGCTATTAATCGGCC	1,2,3,4
TAAAGGATTGTATAAGCGCACAAACGACATTAAATGTGAG	1,2
TGCCTAATGAGTGAGAAAAGCTCATATGTAGCTGA	1,2,3,4
TGCGTACTAATAGTAGTTGAAATGCATATTTCAACGCAAG	1,2
ACTGCCCCTTTCCTGAAAAGCTATATTTTAAATA	1,2,3,4
GTGCCTGCTTTAAACAGGGAGAGAGTTTCAAAGCGAACCA	1,2,3,4
TTAATGAATCGGCCATTCAATCCAATACGCATAGT	1,2,3,4
CGGTTAACAAAGCTGCTGTAACAACAAGGACGTTGGGAAG	1,2,3,4
TGGGCGCCAGGGTGATTCAATAGAGTAACCTGCTC	1,2,3,4
GTGAGTTAAAGGCCGCTGACACTCATGAAGGCACCAACCT	1,2,3
ACAGCTGATTGCCCCGTCGCTGCGCCACACGTTGA	1,2,3,4
GAGAGCCTCAGAACCGCATTTTCTGTAACGATCTAAAGTT	1,2,3,4
GTCCACGCGCCACCTCACCGTTGAAACA	1,2,3,4
GGCGACACCACCCTCAGGTTGTACTGTACCGTTCCAGTAA	1,2,3
GTTTGATGGTGGTTCAGAACCCCGCCTCACAGAAT	2,3,4
CCCTTCATATAAAAGAACGTAGAGCCTTAAAGGTGAATTA	1,3,4
AAAAGAATAGCCCGATACATACGCAGTAAGCTATC	1,2,3,4
TGTTCCAACGCTAACGAACAAGTCAGCAGGGAAGCGCATT	1,3,4
GAACAAGAGTCCACCAATTTTTTAGTTGTCGTAGG	1,2,3,4

CTCCAATTTAGGCAGAGACAATCAATCAAGAAAAATAATA	1,2,3
AGGGCGAAAAACCGATTTAACGTAGGGCAAATACC	1,2,3,4
CCCACATGTGAGTGAATAACTGATGCTTTTAACCTCCGGC	1,2,3,4
ACCATCACCCAAATAAACAGTTTCATTTGATTTCGCC	1,2,3,4
GAGGTAACGTTATTAATTTTAAAACAAATAATGGAAGGGT	1,2,3,4
AGCACTAAATCGGATCGTATTTAGACTTATATCTG	1,2,3,4
ATAGCTGTTTCCTGGAACGTCCATAACGCCGTAAA	1,2,3,4
CCGATAATAAAAAGGGACTTAACACCGCGAACCACCAGCAG	1
TTGACGGGGAAAGCTTCACCAGAAATGGCATCACT	1,2,3,4
AAAGGGCGCTGGCAAGTATTGGC	1,2,3,4
GCTCAAGTTGGGTAACGGGCGGAAAAATTTGTGAGAGATA	1,2,3,4
TTCGCGGATTGATTGCTCATTTTTTTAAC	1,2
TTATGGCCTGAGCACCTCAGAGCATAAA	1,2,3,4
CCGAAC TTAAATAAAAGCAAAGCGGATT	1,2,3,4
TATGCATTACAGAGGATGGTTTAATTTTC	1,2,3
TTCCATTGACCCAAAGAGGCTTTGAGGA	1,2,3,4
TGTAGGGGATTTAGTAACACTGAGTTTC	1,2,3,4
ATTAAAATAAGTGCGACGATTGGCCTTG	1,3,4
AGGGACAAAATCTTCCAGCGCCAAAGAC	1,3,4
AAATAGGTAATTTACAAATAAGAAACGA	1,2,3
ACGCGTCGGCTGTAAGACGACGACAATA	1,2,3,4
TTCGCCATAAACTCTGGAGGTGTCCAGC	1,2,3,4
GAATTATCCAATAACGATAGCTTAGATT	1,2,3,4
TCAATAATAAAGTGTATCATCATATTCC	1
GATAGTGCAACATGATATTTTGAATGG	1
GCGAAAGACGCAAAGCCGCCACGGGAAC	1,2
AATCAGTTAAAACGTGGGAGAAA	1,2,3,4
CAATAGGAACGCAAATTAAGCAA	1,2
TAAAGAGGCAAATATTTTATAA	1,2,3,4
GCTAAATCGGTTTGACTATTATA	1,2,3,4
GTCAGAATCAGGCAGGATTTCGCG	1,2,3,4
GCATCAAAAAGAAGTAAATTGGG	1,2,3,4
CTTGAAAACACCCTAACGGCATA	1,2,3,4
AACTTTAATCATGGGTAGCAACG	1,2,3
GCTACGACAGCAACTAAAAACCG	1,2,3,4
CTAAAGACTTTTAGGAACCCATG	1,2,3,4
TACCGGGATAGCAATGAATATAT	1,2,3,4
GTCACCAGTACAAGGTTGAGGCA	1,2,3,4
GGTCACGCCAGCACAGGAGTTAG	1,2,3,4
ATATTCACAAACAAATTCATATG	1,3,4
GTTTATGTCACATGGGAATCCAC	1,2,3
AAAAGGGCGACAATTATTTATCC	1,3,4
CAATCCAAAATACTGAACAGTAG	1,2,3,4
TTTTTTGTTTAATAAAGTAATTC	1,2,3
TGTCCAAGTACCAGAAACCCAG	1,2,3,4
AACAACATGTTTCATCCTTGAAAA	1,2,3,4
CATAGTTAATTTGTAAATGTTCG	1,2,3,4



ATCAGCGGGGTCAGCTTTCAGAG	1,2,3,4
AAGACGCTGAGACCAGAAGGAGC	1,2,3,4
GGAATCGGAACATTGCACGTAA	1,2,3,4
TGATTATCAGATATACGTGGCAC	1
AGACAACCTGAACAGTATTCGAC	1,2,3,4
CTATTAGTCTTTTCGCCGCTACAG	1
GGCGCCCCGCCGAATCCTGAGAAGTGAGGCCGATTAAAGG	1,2,3,4
GTGGAACGACGGGCTCTCAACTT	1,2,3,4
GGATAACCTCACAATTTTTGTTA	1,2
CCAGCCAAACTTCTGATTGCCGTTTTGGGTAAAGTTAAAC	1,2,3,4
GTTTGAGGGGACCTCATTTGCCG	1,2,3,4
CGTAAAGGTCACGAAACCAGGCAATAGCACCGCTTCTGGT	1,2
CAATATGATATTGATGGGCGCAT	1,2,3,4
GAGACAAAGATTATCAGGTCATTGACGAGAGATCTACAAA	1,2,3,4
AATGCTGTAGCTGAGAAAGGCCG	1,2,3,4
GAGCTTAAGAGGTCCCAATTCTGCAATTCCATATAACAGT	1,2,3,4
TCAACATCAGTTAAATAGCGAGAGTGAGACGACGATAAAA	1,2,3
AAATTGTGTGCGAGAATACCACAT	1,2,3,4
ATTTGCCAAGCGGAACTGACCAACGAGTCAATCATAAGGG	1,2,3,4
ATTGCGAATAATGTACAACGGAG	1,2,3,4
GAAAGTTCAACAATCAGCTTGCTTAGCTTTAATTGTATCG	1,2,3,4
CTATTTTCGGAACGAGTGAGAATA	1,2,3,4
AACAGAGTGCCTGGGGTTTTGCTCACAGAAGGATTAGGAT	1,2,3,4
GCAGCACCGTAAGTGCCCGTATA	1,2,3,4
ACCAAATTACCAGGTCATAGCCCCGAGTTTTTCATCGGCAT	1,3,4
TAAGCCAGAGAGCCAGAAGGAACTCGATAGCCGAACAAA	1,2,3
AGCAAGCCGTTTAAGAATTGAGT	1,2,3,4
ACCGCATTCCAACGGTATTCTAAGCGAGATATAGAAGGCT	1,2,3,4
TGACCTAAATTTTAAACCAAGT	1,2,3,4
TTTAGAACGCGAATTACTAGAAAACATAAACACCGGAAT	1,2,3,4
CATCGGGAGAAATTCAAATATAT	1,2,3,4
TCAGAGGTGTGTGCGCCAGAATGAGTGCACTCTGTGGT	1,2,3,4
ACAGTTTTTTCAGATTTCAATTACCGTCGCAGAGGCGAATT	1,2,3,4
CAAATATCAAACCAGATGAATAT	1,2,3,4
GCATCGAGCCAGATATCTTTAGGACCTGAGGAAGGTTATC	1
TACTTCTTTGATAAAAAATCTAAA	1,2,3,4
CATAATATTCCGTAATGGGATCCGTGCATCTGCCA	1,2,3,4
GTATACAGGTAATGTGTAGGTAGTCAAATCACCAT	1,2,3,4
TGTAAATCATGCTCCTTTTGATAATTGCTGAATAT	1,2,3,4
CGCCTGACGGTAGAAAGATTCTAATGCAGATACAT	1,2,3,4
GCGCAGCGACCAGCGATTATATATCATCGCCTGAT	1,2,3,4
TTCATTTTCTGCTAAACAACGAACAATAAAGGA	1,2,3,4
ATCAGAGCCTTTAACGGGGTCTTAATGCCCCCTGC	1,2,3,4
AGAGTTTATACCAGTAGCACCTGAAACCATCGATA	1,2,3,4
CATGCCAGTGAGCGCTAATATCCAATAATAAGAGC	1,2,3,4
TTGAGAATATCTTTCCTTATCACTCATCGAGAACA	1,2,3,4
TTCGCTATTGCAAGACAAAGTTAATTTTCATCTTC	1,2,3,4

ACATCATTTAAATTGCGTAGAAACAGTACCTTTTA	1,2,3,4
ATACCCCTTCGTGCCACGCTGAACCTTGCTGAACCT	1,2,3,4
AACGTTGTAGAAACAGCGGATAGTTGGGCGGTTGT	1,2,3,4
TCAGGTGAAATTTCTACGGAAACAATCG	1,2,3,4
TAAATCGGTTGGTGCACATCAAAAATAA	1,2,3,4
TGCAACTCAAAAGGCCGTACCAAAAACA	1,2,3,4
AAGAGATTCATTTTGTTTAAGAGGAAGC	1,2,3,4
CATGTCAGAGATTTGATGTGAATTACCT	1,2,3,4
AAATCCCCGAAACAATTCATGAGGAAGT	1,2,3,4
TGAAATTGTTTCAGGGAAC TACAACGCC	1,2,3,4
CAAGTGCTGAGTAAGAAAATAAATCCTC	1,2,3,4
TTACCTCTTAGCAAATTTCAACCGATTG	1,2,3,4
AATCATAATAACCCGGCGTCAAAAATGA	1,2,3,4
GACCGTCGAACGGGGAAGCTAATGCAGA	1,2,3,4
TGATTTAGAAAAC TCAAGAGTCAATAGT	1,2,3,4
GTCAGTCGTTTAACGAGATGGCAATTCA	1,2,3,4
TGCCTGAACAGCAAATGAATGCGCGAACT	1,2,3,4
AAAAGTGTCAGCAACAATTGCAGGCGCT	1,2,3,4
GAAAGATCGCACTCCAGCCAGCT	1,2
TTCCGAATTGTAAACGTGTCGCCAGCATCGGTGCGGGCCT	1,2
GCTAATGCCGGAGAGGGTAGCTA	1,2
TTTTTATCCAATAAATCTCTACCCCGGTAAAACTAGCATG	1,2
GGCTAAAGTACGGTGTCTGGAAG	1,2,3,4
TTTCACGAGAATGACCATTTTCATTTGGTCAATAACCTGT	1,2,3,4
TGCAACACTATCATAACCCCTCGT	1,2,3
TTACCAATAAGGCTTGCAAGTGCAGTGGTGGATA	1,2,3,4
ACTACTTAGCCGGAACGAGGCGC	1,2,3,4
AGACGTCGTCACCCTCAGATCTTGACGCTGGCTGACCTTC	1,2,3
AATCCAAAAAAAAGGCTCCAAAA	1,2,3,4
GGAGCAGCCACCACCCTTCGCATAACGACAATGACAACAA	1,2,3,4
GTGTATTAAGAGGCTGAGACTCC	1,2,3,4
TCAAGCAGAACCACTCACTCAGGTAGCCCGGAATAGG	1,2,3,4
TATTGCCTTTAGCGTCAGACTGT	1,2,3,4
AGCGCCACCACGGAATACGCCTCAGACCAGAGCCACCACC	1,3,4
TTGAAGCCCTTTTAAAGAAAAGT	1,2,3
AAGCACAGAGCCTAATTATTGTTAGCGATTAAGACTCCTT	1,3,4
GTTTACCGCGCCCAATAGCAAGC	1,2,3,4
AAATCAGCCAGTAATAACACTATTTTTGAAGCCTTAAATC	1,2,3
TATGTGATAAATAAGGCGTTAAA	1,2,3,4
TAAGATCTGTAAATCGTTGTTAATTGTAAAGCCAACGCTC	1,2,3,4
CAGCTTTGAATACCAAGTTACAA	1,2,3,4
AATCGTTGAGTAACATTGGAATTACCTAATTACATTTAAC	1,2,3,4
ATTTGGCAAATCAACAGTTGAAA	1
GCCCGCACAGGCGGCCTTTAGTG	1,2,3,4
GGAATAACAGAGATAGACATACAACTTGAGGATTTAGAA	1
TAAGTAGAAGAACTCAAACTATCG	1
GCCTTACGCTGCGCGTAAAATTATTTTTTGACGCTCAATC	1

ATGAATCCCAGTCACGATCGAACGTGCCGGCCAGAGCACA	1,2,3,4
CTTTTTTTCGTCTCGTCGCTGGC	1,2,3,4
GGGCGTGAAATATTAGCGCCATTTCGC	1,2,3,4
TCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAA	1,2
TAATCGTAGCATTACCTGAGAGTCTG	1,2,3,4
TTAACAAGAGAATCGATGAACGG	1,2
CAAATGGTTCAGAAGAACGAGTAGAT	1,2,3,4
GCTTGACCATTAGATACATTTTCG	1,2,3,4
AAAATTCCATTTCAGGCTTTTGCAAAA	1,2,3,4
ATTTTGCCAGAGGGGGTAATAGT	1,2,3
CATAGAATTTGCGGTTTGAAAGAGGA	1,2,3,4
CCGAACGGTGTACAGACCAGGCG	1,2,3,4
GCGCCCGCACCCCTCTCGAGGTGAATT	1,2,3,4
TGAACAGCTTGATACCGATAGTT	1,2,3,4
AAGTAAGAGCCGCCAGTACCAGGCGG	1,2,3,4
GGTGCCGTCGAGAGGGTTGATAT	1,2,3,4
CGGAAGCACGCAAACCTATTAGCGTT	1,2,3,4
ATTCTTTTCATAATCAAAATCAC	1,2,3,4
CAGCATCAACCGCACGGCGGGCCGTT	1,2,3,4
GGCATAAGCGTCTTCGAGGAAACGCA	1,2,3,4
AAAACGGAATACCCAAAAGAACT	1,3
GGTTTGCGCATTTTAAACGCGAGGCGT	1,2,3,4
AACGAACCTCCCGACTTGCGGGA	1,2,3,4
CAGTAAGAACCTTGAGCCTGTTTAGT	1,2,3
AAATGCGTTATACAAATTCTTAC	1,2,3,4
AAAATTTTTTAAATGAGCAAAAAGAA	1,2,3,4
GTTGAAACAAACATCAAGAAAAC	1
TACATAAATTCTGGGCACTAACAACT	1,2,3,4
TCGGTCATACCGGGGGTTTCTGC	1,2,3,4
AGCCTCCCCAGGGTCCGGCAAACGCG	1,2,3,4
GTCCGTCCTGCAAGATCGTCGGATTCTCTTCGCATTGGACGA	1,2,3,4
CATTCAACCCAAAATGTAGAACCCTCATGAATTAGTACAACC	1,2,3,4
GAGCAAGGTGGCATTTACTCCAACAGGTTCTTTACGTCAACA	1,2,3,4
TTAGTGTGAATCCCTCTAATAAAACGAAAGAACGATGAATTA	1,2,3,4
GAAGTCAACCCAAATGGCAAAAGAATACTCGGAACAGAATCC	1,2,3,4
CAGATATAGGCTTGAACAGACGTTAGTAAAGCCCCAAAATTT	1,2,3,4
TCTTATACTCAGAAAGGCTTTTGATGATATTGACACGCTATT	1,2,3,4
ATAAGAAGCCACCCAAACTTGAGCCATTATCAATACATCAGT	1,2,3,4
TGCCATACATAAAGATTAACTGAACACCAACAGCCGGAATAG	1,2,3,4
ATAATGAATCCTGAGATTACGAGCATGTGACAAAACTTATT	1,2,3,4
TTTAGCAAACGCCACAATATAACTATATTCCCTTATAAATGG	1,2,3,4
ATCATTTACATAAAAAGTATCAAAATTATAAGAACTTCAATA	1,2,3,4
GATGAATAAATCCTGTAGGTGAGGCGGTAGCGTAAGTCCTCA	1,2,3,4
TTCACCTAGCGTGCGGGGTGAAGGGATACCAGTGCATAAAAA	1,2,3,4
AATAGCTGTCACACGCAACGGTACGCCAGCGCTTAATGTAGTA	1,2,3,4

(C)

Biotin-modifizierte DNA-Stränge für rechteckige DNA-Origami-Strukturen für DNA-PAINT (65 nm bzw. 32,5 nm, s. Kapitel Rückführung von fluoreszenzmarkierten DNA-Origami-Strukturen):

Sequenz 5' - 3'
Biotin-GAGAAGAGATAACCTTGCTTCTGTTCGGGAGAAACAATAA
Biotin-GAAACGATAGAAGGCTTATCCGGTCTCATCGAGAACAAGC
Biotin-CGGATTCTGACGACAGTATCGGCCGCAAGGCGATTAAGTT
Biotin-AGCCACCACTGTAGCGCGTTTTCAAGGGAGGGAAGGTAAA
Biotin-ATAAGGGAACCGGATATTCATTACGTCAGGACGTTGGGAA
Biotin-TAGAGAGTTATTTTCATTTGGGGATAGTAGTAGCATTA

DNA-Ankerstränge für rechteckige DNA-Origami-Strukturen für DNA-PAINT (65 nm bzw. 32,5 nm, s. Kapitel Rückführung von fluoreszenzmarkierten DNA-Origami-Strukturen):

Sequenz 5' - 3':
<b>Für beide Abstände (65 nm and 32,5 nm):</b>
GATTTAGTCAATAAAGCCTCAGAGAACCCTCATTAAATGCCCG
AAATTAAGTTGACCATTAGATACTTTTGCGTTAAATGCCCG
ATGCAGATACATAACGGGAATCGTCATAAATAAAGCAAAGTTAAATGCCCG
CGGATTGCAGAGCTTAATTGCTGAAACGAGTATTAAATGCCCG
GATGGCTTATCAAAAAGATTAAGAGCGTCCTTAAATGCCCG
GCTATCAGAAATGCAATGCCTGAATTAGCATTAAATGCCCG
AACAAGAGGGATAAAAATTTTGTAGCATAAAGCTTAAATGCCCG
TAAATCGGGATTCCCAATTCTGCGATATAATGTTAAATGCCCG
CTGTAGCTTGACTATTATAGTCAGTTCATTGATTAAATGCCCG
<b>Nur für 32,5 nm:</b>
CCAATAGCTCATCGTAGGAATCATGGCATCAATTAAATGCCCG
TTAACGTCTAACATAAAAACAGGTAACGGATTAAATGCCCG
AGAGAGAAAAAATGAAAATAGCAAGCAAACCTTAAATGCCCG
CAACCGTTTCAAATCACCATCAATTTCGAGCCATTAAATGCCCG
CATGTAATAGAATATAAAGTACCAAGCCGTTTAAATGCCCG
CCAACAGGAGCGAACCAGACCGGAGCCTTTACTTAAATGCCCG
TTCTACTACGCGAGCTGAAAAGGTTACCGCGCTTAAATGCCCG
TTTTATTTAAGCAAATCAGATATTTTGTGTTTAAATGCCCG
TTATTACGAAGAACTGGCATGATTGCGAGAGGTTAAATGCCCG
<b>Nur für 65 nm:</b>
GAAACGATAGAAGGCTTATCCGGTCTCATCGAGAACAAGCTTAAATGCCCG
CTTATCATTCCCGACTTGCGGGAGCCTAATTTTTTAAATGCCCG
GCCAGTTAGAGGGTAATTGAGCGCTTTAAGAATTAAATGCCCG

GTTTATTTTGTGCACAATCTTACCGAAGCCCTTTAATATCATTTAAATGCCCCG
TTAGTATCACAATAGATAAGTCCACGAGCATTTAAATGCCCCG
TGTAGAAATCAAGATTAGTTGCTCTTACCATTAAATGCCCCG
GAGAGATAGAGCGTCTTTCCAGAGGTTTTGAATTAAATGCCCCG
ACGCTAACACCCACAAGAATTGAAAATAGCTTTAAATGCCCCG
GCCTTAAACCAATCAATAATCGGCACGCGCCTTTAAATGCCCCG

Unmodifizierte DNA-Sequenzen für rechteckige DNA-Origami-Strukturen für DNA-PAINT (65 nm bzw. 32,5 nm, s. Kapitel Rückführung von fluoreszenzmarkierten DNA-Origami-Strukturen):

Sequence 5' - 3'
CATAAATCTTTGAATACCAAGTGTTAGAAC
GATGTGCTTCAGGAAGATCGCACAAATGTGA
GCAATTCACATATTCTTGATTATCAAAGTGTA
TCACCAGTACAACTACAACGCCTAGTACCAG
GCTTTCCGATTACGCCAGCTGGCGGCTGTTTC
AAAGGCCGGGAGACAGCTAGCTGATAAATTAATTTTTGT
AAGCCTGGTACGAGCCGGAAGCATAGATGATG
TCATTCAGATGCGATTTTAAGAACAGGCATAG
GCCATCAAGCTCATTTTTTAACCACAAATCCA
TATAACTAACAAAGAACGCGAGAACGCCAA
TTGCTCCTTTCAAATATCGCGTTTGAGGGGGT
GTATAGCAAACAGTTAATGCCCAATCCTCA
AAAGTCACAAAATAAACAGCCAGCGTTTTTA
GGCCTTGAAGAGCCACCACCCTCAGAAACCAT
AGTATAAAGTTCAGCTAATGCAGATGTCTTTC
TCAAATATAACCTCCGGCTTAGGTAACAATTT
TTTCGGAAGTGCCGTCGAGAGGGTGAGTTTCG
GAGGGTAGGATTCAAAAGGGTGAGACATCCAA
TATTAAGAAGCGGGGTTTTGCTCGTAGCAT
GCCCTTCAGAGTCCACTATTAAAGGGTGCCGT
AGCCAGCAATTGAGGAAGGTTATCATCATTTT
TAAATGAATTTTCTGTATGGGATTAATTTCTT
AAACAGCTTTTTTGCGGGATCGTCAAACTAAA
GCGCAGACAAGAGGCAAAAAGAATCCCTCAG
GACAAAAGGTAAAGTAATCGCCATATTTAACAAAACTTTT
ACACTCATCCATGTTACTTAGCCGAAAGCTGC
CTACCATAGTTTGAGTAACATTTAAAATAT
TATATTTTGTCAATTGCCTGAGAGTGGAAGATTGTATAAGC
TAAATCATATAACCTGTTTAGCTAACCTTTAA
GTACCGCAATTCTAAGAACGCGAGTATTATTT
TCTTCGCTGCACCGCTTCTGGTGCGGCCTTCC
GCAAGGCCTCACCAGTAGCACCATGGGCTTGA
ATTACCTTTGAATAAGGCTTGCCCAAATCCGC
CTTATCATTTCCCGACTTGCGGGAGCCTAATTT

TTATACCACCAAATCAACGTAACGAACGAG
GTAATAAGTTAGGCAGAGGCATTTATGATATT
GATGGTTTGAACGAGTAGTAAATTTACCATTA
GCACAGACAATATTTTTGAATGGGGTCAGTA
AGCAAGCGTAGGGTTGAGTGTGTAGGGAGCC
TCCACAGACAGCCCTCATAGTTAGCGTAACGA
ATTATACTAAGAAACCACCAGAAGTCAACAGT
TAAGAGCAAATGTTTAGACTGGATAGGAAGCC
ATACATACCGAGGAAACGCAATAAGAAGCGCATTAGACGG
CAACTGTTGCGCCATTCGCCATTCAAACATCA
TAGGTAAACTATTTTTGAGAGATCAAACGTTA
AGGCAAAGGGAAGGGCGATCGGCAATTCCA
ATTATCATTCAATATAATCCTGACAATTAC
GAAATTATTGCCTTTAGCGTCAGACCGGAACC
AATGGTCAACAGGCAAGGCAAAGAGTAATGTG
ATACCCAACAGTATGTTAGCAAATTAGAGC
CACCAGAAAGGTTGAGGCAGGTCATGAAAG
ATCCCAATGAGAATTAACCTGAACAGTTACCAG
GACCTGCTCTTTGACCCCCAGCGAGGGAGTTA
AGGAACCCATGTACCGTAACACTTGATATAA
CAGCGAAACTTGCTTTCGAGGTGTTGCTAA
ACAACTTTC AACAGTTTCAGCGGATGTATCGG
CAGCAAAAGGAAACGTCACCAATGAGCCGC
ACCTTTTTATTTTAGTTAATTTTCATAGGGCTT
CGATAGCATTGAGCCATTTGGGAACGTAGAAA
GCCCGAGAGTCCACGCTGGTTTGCAGCTAACT
ATTTTAAATCAAATATTGTCACGGATTTCG
ACCTTGCTTGGTCAGTTGGCAAAGAGCGGA
CTGAGCAAAAATTAATTACATTTTGGGTTA
CCTGATTGCAATATATGTGAGTGATCAATAGT
TCAATATCGAACCTCAAATATCAATTCCGAAA
CTTTAGGGCCTGCAACAGTGCCAATACGTG
AATAGTAAACACTATCATAACCCTCATTGTGA
TCACCGACGCACCGTAATCAGTAGCAGAACCG
GCCCGTATCCGGAATAGGTGTATCAGCCCAAT
TGTAGCCATTAAAATTCGCATTAAATGCCGGA
TCGGCAAATCCTGTTTGATGGTGGACCCTCAA
TGACAACTCGCTGAGGCTTGCAATTATACCA
CCACCCTCTATTCACAAACAAATACCTGCCTA
CCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAAAGAATA
AAGTAAGCAGACACCACGGAATAATATTGACG
CACATTAAAATTGTTATCCGCTCATGCGGGCC
TTAAAGCCAGAGCCGCCACCCTCGACAGAA
ATATTCGGAACCATCGCCACGCAGAGAAGGA
AACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAACCAGTAA
GAATTTATTTAATGGTTTGAAATATTCTTACC
AGCGCGATGATAAATTGTGTCGTGACGAGA
AACGCAAAGATAGCCGAACAAACCCTGAAC

GCCTCCCTCAGAATGGAAAGCGCAGTAACAGT
AAAGCACTAAATCGGAACCCTAATCCAGTT
AAGGCCGCTGATACCGATAGTTGCGACGTTAG
CTTTTGCAGATAAAAACCAAATAAAGACTCC
CCTAAATCAAAATCATAGGTCTAAACAGTA
AGACGACAAAGAAGTTTTTGCCATAATTCGAGCTTCAA
AGAAAACAAAGAAGATGATGAAACAGGCTGCG
CGCGCAGATTACCTTTTTTAATGGGAGAGACT
CACAACAGGTGCCTAATGAGTGCCCAGCAG
GCGGAACATCTGAATAATGGAAGGTACAAAAT
TAAAAGGGACATTCTGGCCAACAAAGCATC
AATTGAGAATTCTGTCCAGACGACTAAACCAA
GCGAAAAATCCCTTATAAATCAAGCCGGCG
AACACCAAATTTCAACTTTAATCGTTTACC
TAAATCAAAATAATTCGCGTCTCGGAAACC
GCGAACCTCCAAGAACGGGTATGACAATAA
TTAGGATTGGCTGAGACTCCTCAATAACCGAT
ATCGCAAGTATGTAAATGCTGATGATAGGAAC
GCGGATAACCTATTATTCTGAAACAGACGATT
AAGGAAACATAAAGGTGGCAACATTATCACCG
ACCCTTCTGACCTGAAAGCGTAAGACGCTGAG
ATATTTTGGCTTTCATCAACATTATCCAGCCA
TCAAGTTTCATTAAAGGTGAATATAAAAGA
TCTAAAGTTTTGTCTGCTTTTCCAGCCGACAA
TTCCAGTCGTAATCATGGTCATAAAAGGGG
AATACTGCCCAAAGGAATTACGTGGCTCA
TTTATCAGGACAGCATCGGAACGACACCAACCTAAAACGA
TTGACAGGCCACCACCAGAGCCGCGATTGTGA
CTGTGTGATTGCGTTGCGCTCACTAGAGTTGC
GCGAGTAAAAATATTTAAATTGTTACAAAG
CGAAAGACTTTTGATAAGAGGTCATATTTGCGA
TCATCGCCAACAAAGTACAACGGACGCCAGCA
TTAACACCAGCACTAACAATAATCGTTATTA
ACAACATGCCAACGCTCAACAGTCTTCTGA
CATTTGAAGGCGAATTATTCATTTTTGTTTTGG
TGAAAGGAGCAAATGAAAAATCTAGAGATAGA
TGGAACAACCGCCTGGCCCTGAGGCCCGCT
TACCGAGCTCGAATTCGGGAAACCTGTCGTGCAGCTGATT
ACAAACGGAAAAGCCCCAAAAACACTGGAGCA
GTTTATCAATATGCGTTATACAAACCGACCGTGTGATAAA
ACGGCTACAAAAGGAGCCTTTAATGTGAGAAT
GACCAACTAATGCCACTACGAAGGGGGTAGCA
CTCCAACGCAGTGAGACGGGCAACCAGCTGCA
ACCGATTGTCTGGCATTTTCGGTCATAATCA
CAGAAGATTAGATAATACATTTGTCGACAA
TGCATCTTTCCCAGTCACGACGGCCTGCAG
GTTTTAACTTAGTACCGCCACCCAGAGCCA
TTAATGAACTAGAGGATCCCCGGGGGGTAACG

CTTTTACAAAATCGTCGCTATTAGCGATAG
ATCCCCCTATACCACATTCAACTAGAAAAATC
AGAAAGGAACAACATAAGGAATTCAAAAAAA
GCCGTCAAAAAACAGAGGTGAGGCCTATTAGT
CCACCCTCATTTTCAGGGATAGCAACCGTACT
CTTTAATGCGCGAACTGATAGCCCCACCAG
CCAGGGTTGCCAGTTTGAGGGGACCCGTGGGA
CAAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAAACGTGGA
TACGTTAAAGTAATCTTGACAAGAACCGAACT
TAATCAGCGGATTGACCGTAATCGTAACCG
TTTTCACTCAAAGGGCGAAAAACCATCACC
AATAGCTATCAATAGAAAATTCAACATTCA
CATCAAGTAAAACGAACTAACGAGTTGAGA
CAGGAGGTGGGGTCAGTGCCTTGAGTCTCTGAATTTACCG
AAATCACCTTCCAGTAAGCGTCAGTAATAA
CTCGTATTAGAAATTGCGTAGATACAGTAC
TTTACCCCAACATGTTTTAAATTTCCATAT
GTGCACTTCGGCCAACGCGCGGGGTTTTTTC
CGTAAAACAGAAATAAAAAATCCTTTGCCCGAAAGATTAGA
AGGCTCCAGAGGCTTTGAGGACACGGGTAA
TTTAGGACAAATGCTTTAAACAATCAGGTC
AATACGTTTGAAAGAGGACAGACTGACCTT
CTTAGATTTAAGGCGTTAAATAAAGCCTGT
AACAGTTTTGTACCAAAAACATTTTATTTT
AACGCAAAATCGATGAACGGTACCGGTTGA



## 10 Abbildungsverzeichnis

2.1	Superauflösung versus Beugungsgrenze . . . . .	10
2.2	DNA-Origami-Nanotechnologie . . . . .	11
3.1	Grundlagen der Fluoreszenz . . . . .	14
3.2	Weitfeld- und konfokales Fluoreszenzmikroskop . . . . .	16
3.3	Totale interne Reflexion . . . . .	17
3.4	Vergleich zwischen Ensemble- und Einzelmolekülmessungen . . . . .	19
3.5	Chemische Strukturen der synthetischen Fluoreszenzfarbstoffe . . . . .	22
3.6	Fluoreszierende Proteine . . . . .	24
3.7	Absorptions- und Emissionsspektrum von wtGFP . . . . .	25
3.8	Beispiele von Fluorophorzentren spektral unterschiedlicher FPs . . . . .	25
3.9	Weitfeld-Fluoreszenzbilder von subzellulären Strukturen markiert mit FPs . . . . .	27
3.10	Zwei-Zustands-Modell eines Fluoreszenzfarbstoffmoleküls . . . . .	29
3.11	Simulierte Fluoreszenzspur . . . . .	30
3.12	Photobleichen am Beispiel eines Cyanin-Farbstoffs . . . . .	31
3.13	ROXS-Wirkungsmechanismus . . . . .	32
3.14	Umwandlung von Trolox zu Troloxchinon . . . . .	32
3.15	Photophysikalisches Verhalten von Cyanin-Farbstoffen . . . . .	33
3.16	Reduktionsmittel als Triplett-Quencher . . . . .	34
3.17	Schematische Darstellung von Dexter-Energietransfer und COT . . . . .	34
3.18	Punktabbildungsfunktion . . . . .	35
3.19	Das Rayleigh-Auflösungskriterium . . . . .	37
3.20	STED-Mikroskopie . . . . .	39
3.21	Querschnitt der lateralen PSF . . . . .	41
3.22	LB-Superauflösungsmikroskopie . . . . .	42
3.23	Der Effekt der Doppellokalisierungen . . . . .	44
3.24	Einflussfaktoren auf die LB-Superauflösungsmikroskopie . . . . .	45
3.25	Cy5 als molekularer Photoschalter . . . . .	46
3.26	Kombination von COT mit dSTORM . . . . .	48
3.27	Unterschiedliche Typen von FPs für LB-Superauflösungsmikroskopie . . . . .	49
3.28	PALM-Superauflösungsmikroskopie mit EosFP . . . . .	50
3.29	Superauflösungsmikroskopie von Filamenten . . . . .	52
3.30	Skizze einer doppelsträngigen DNA und vierarmigen DNA-Struktur . . . . .	53
3.31	Schematische Darstellung der DNA-Origami-Technik . . . . .	55

3.32	Schematische Darstellung von 2D- und 3D-DNA-Origami-Strukturen . . .	56
3.33	Superauflösungsmikroskopie von DNA-Origami-Nanometerlinealen . . . . .	57
4.1	Agarosegel-Elektrophorese . . . . .	63
4.2	Passivierung von Lab-Tek-Kammern mit BSA-Biotin und NeutrAvidin . .	64
4.3	Schematischer Aufbau eines Weitfeld-Fluoreszenzmikroskops . . . . .	66
4.4	EMCCD-Kamera . . . . .	68
4.5	TIRF-Mikroskope . . . . .	69
4.6	Objektmikrometer . . . . .	71
4.7	Ermittlung der mittleren Pixelgröße des EMCCD-Kamerachips . . . . .	73
4.8	caDNAno-Darstellung . . . . .	74
4.9	Skizze einer 12HB-DNA-Origami-Struktur . . . . .	75
4.10	Spoterkennung mittels relativer Helligkeit . . . . .	76
4.11	Hintergrundkorrektur von Fluoreszenzspuren . . . . .	77
4.12	Automatische Abstandsbestimmung eines Doppelspots . . . . .	79
5.1	Einzelmolekül-Fluoreszenzspuren von Alexa647 . . . . .	81
5.2	Einfluss der UV-Bestrahlung auf ROXS . . . . .	82
5.3	Einzelmolekülmessungen von Alexa647 unter unterschiedlichen Beleuch- tungsbedingungen . . . . .	83
5.4	Vorgeschlagener ROXS/dSTORM-Mechanismus . . . . .	84
5.5	Fluoreszenzspur von Alexa647 mit zweifacher TQ-Konzentration . . . . .	85
5.6	Zusätzliche Kinetikdaten von Alexa647 . . . . .	85
5.7	LB-Mikroskopie unter dSTORM, ROXS/dSTORM und COT/dSTORM . .	87
5.8	Absorptions- und Emissionsspektren von aufgereinigtem EYFP . . . . .	90
5.9	Zwei-Schritt-Reaktion für die sSMCC-vermittelte Kopplung . . . . .	90
5.10	Superdex-Gelfiltrationschromatographie . . . . .	91
5.11	Aufreinigung und Analyse von EYFP-DNA . . . . .	92
5.12	12HB-DNA-Origami-Struktur markiert mit einem EYFP und Atto647N und entsprechende Einzelmoleküldaten . . . . .	93
5.13	Analyse von photophysikalischen Eigenschaften von EYFP . . . . .	94
5.14	Skizze eines EYFP-12HB-Nanometerlineals und AFM-Aufnahmen . . . . .	96
5.15	Wechselwirkung von EYFP mit Nanoantikörper . . . . .	97
5.16	LB-Mikroskopie von EYFP-12HB . . . . .	99
5.17	2-Farben-Superauflösungsmikroskopie von 12HB und <i>Vero</i> -Säugerzellen . .	100
5.18	Verbesserung der Lokalisierungsgenauigkeit von EYFP . . . . .	101
5.19	DNA-PAINT-Superauflösungsmikroskopie . . . . .	104

5.20	Ishikawa-Diagramm . . . . .	105
5.21	Mikroskopisches Bild des benutzten Objektmikrometers . . . . .	106
5.22	Mittlere Abstände zwischen zwei Markierungen mit DNA-PAINT . . . . .	112
6.1	PALM-Superauflösungsmikroskopie . . . . .	117
9.1	a. Histogramme von Alexa647-Kinetikdaten . . . . .	133
9.2	b. Histogramme von Alexa647-Kinetikdaten . . . . .	134
9.3	c. Histogramme von Alexa647-Kinetikdaten . . . . .	134
9.4	Kinetikdaten von Cy5 . . . . .	135
9.5	Abstandshistogramme . . . . .	135
9.6	Superdex-Gelfiltrationschromatographie von EYFP . . . . .	136
9.7	Demonstration von UV-Photoreaktivierung von EYFPs . . . . .	136
9.8	Automatischer Auswertungsalgorithmus mit und ohne nachträglicher manueller Auslese der Strukturen . . . . .	137
9.9	Variation der Standardabweichungen der Lokalisierungswolken . . . . .	137
9.10	Ergebnisse von Monte-Carlo-Simulationen . . . . .	138
9.11	Einfluss der Blinkkinetik auf die Messunsicherheit . . . . .	138

## 11 Tabellenverzeichnis

4.1	Kalibrierergebnisse des Objektmikrometers . . . . .	72
5.1	Das Messunsicherheitsbudget für die mittlere Pixelgröße (Mikroskop 1). . .	108
5.2	Zusammenfassung der Bestimmung der mittleren Pixelgröße und deren Messunsicherheit . . . . .	109
5.3	Das Messunsicherheitsbudget für die Bestimmung des mittleren Abstands .	112
9.1	(SDS)-PAGE . . . . .	132
9.2	Bedingungen für Monte-Carlo-Simulationen . . . . .	138

## 12 Danksagung

Ich danke allen Menschen, die mich bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit tatkräftig unterstützt haben.

Mein größter Dank gilt Prof. Dr. Tinnefeld, der mich im Laufe meiner Promotion betreut hat. Ich danke für die thematische Fülle der von mir bearbeiteten Projekte, die sich wie ein roter Faden durch die gesamte Promotion zogen. Des Weiteren trugen zahlreiche konstruktive wissenschaftliche Diskussionen mit Prof. Dr. Tinnefeld zu einer erfolgreichen Umsetzung der Projektziele bei. Ebenso danke ich ihm für eine angenehme Arbeitsatmosphäre, begleitet von latentem Anstiften zum Fußballspielen und Weltrettungsparolen.

Ein besonderer Dank gilt Mario Raab für eine sachliche und zielorientierte Zusammenarbeit sowie Vermittlung seines Fachwissens im Bereich der Superauflösungsmikroskopie. Ebenso waren seine Beiträge zu nanometrologischen Fragestellungen von großer Bedeutung.

Ich danke Dr. Carsten Forthmann, dessen schnelle mathematische Auffassungsgabe viele wissenschaftliche Auseinandersetzungen geprägt und beschleunigt haben. Durch die Entwicklung der LabVIEW-basierten Auswerteprogramme hat er einen Beitrag zur Weiterentwicklung der Nanometerlineale in der Arbeitsgruppe beigesteuert. Ebenso danke ich ihm für die interessanten kulturellen Diskussionen.

Ich danke Bettina Wünsch für den wissenschaftlichen Austausch und Impulse sowie mentale Unterstützung.

Desweiteren danke ich den Mitarbeitern der PTB Dr. Egbert Buhr, Dr. Bernd Bodermann, Detlef Bergmann, Dr. Harald Bosse aus Braunschweig für eine erfolgreiche Kooperation und Kalibrierung des Objektmikrometers im Rahmen des Nanometrologie-Projektes.

Mein Dank gilt Dr. Thorben Dammeyer für die Bereitstellung der Plasmide und die Einführung in die Mikrobiologie. Enrico Pibiri danke ich für die AFM-Aufnahmen.

Ich danke dem Braunschweiger Nanomet-Graduiertenkolleg und Prof. Dr. Schilling für die Organisation und Weiterbildung der Doktoranden an der TU Braunschweig.

Für ein tolles Arbeitsklima und viele spannende soziale Events bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Tinnefeld und der GATTAquant GmbH.

Ich danke meiner Schwester Larissa Jusuk-Pardell und meinem Freund Mario Raab für die erbrachte Geduld, Verständnis und Unterstützung in den letzten Jahren.

Ich danke Andi Gietl für die schöne, aber leider viel zu kurze Zeit auf Erden, die du mit uns verbracht hast. Dein vertrautes Pfeifen hallt in den Gängen des Instituts nach.